



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA  
Faculdade de Medicina Veterinária

POTENCIAL PROBIÓTICO DO QUEIJO DA ILHA DE SÃO JORGE E DO PARMESÃO

ANA SOFIA GUERREIRO MARQUES DIAS

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor António Salvador Ferreira Henriques Barreto  
Doutora Ana Cristina Gaspar Nunes Lobo Vilela  
Doutor Fernando Manuel D'Almeida Bernardo  
Doutora Marília Catarina Leal Ferreira

ORIENTADOR

Doutor Fernando Manuel D'Almeida  
Bernardo

2012  
LISBOA



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

POTENCIAL PROBIÓTICO DO QUEIJO DA ILHA DE SÃO JORGE E DO PARMESÃO

ANA SOFIA GUERREIRO MARQUES DIAS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SEGURANÇA ALIMENTAR

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor António Salvador Ferreira Henriques Barreto  
Doutora Ana Cristina Gaspar Nunes Lobo Vilela  
Doutor Fernando Manuel D'Almeida Bernardo  
Doutora Marília Catarina Leal Ferreira

ORIENTADOR

Doutor Fernando Manuel D'Almeida  
Bernardo

2012  
LISBOA

## **Agradecimentos**

Ao Professor Doutor Fernando Bernardo por ter aceite orientar este trabalho, agradeço o incansável apoio e disponibilidade, enriquecido pela constante partilha de conhecimentos.

Ao Senhor Professor Luís Tavares coordenador do CIISA pela disponibilização dos recursos financeiros essenciais para a execução deste trabalho.

À Dr<sup>a</sup>. Anabela Lança e à Dona Glória pelo auxílio prestado no laboratório, sempre com simpatia.

À Dr<sup>a</sup>. Anabela Vitória da Promolac, empresa representante da Chr. Hansen em Portugal, pela gentileza em ceder a cultura de *Bifidobacterium animalis subsp lactis*.

Aos meus pais pelo apoio incondicional de toda a vida e à minha irmã Rita pelo companheirismo e amizade.

Aos meus amigos pelos bons momentos de diversão durante a elaboração deste trabalho.

E ao Alessandro pela lição de “Parmigiano Reggiano” que inspirou a elaboração deste trabalho.

## Potencialidade probiótica do Queijo da Ilha de São Jorge e do Parmesão

### Resumo

Estão oficialmente reconhecidas as características benéficas para a saúde da pasta do queijo Parmesão. Neste trabalho procedeu-se a ensaios comparativos entre a microbiota do queijo de origem italiana e de um queijo português, com características semelhantes, tendo em vista dar início a um processo de estudo do potencial probiótico do queijo da Ilha de São Jorge.

Procedeu-se a uma caracterização genérica da microbiota láctica dos dois queijos e procurou-se avaliar as interações bióticas directas dessas bactérias sobre três agentes bacterianos do intestino humano: uma patogénica (*Shigella dysenteriae*), uma comensal (*Enterococcus faecium*) e uma útil (*Bifidobacterium animalis subsp lactis*).

Constatou-se que dos 225 isolados autóctones testados, foram seleccionados 67 que possuíam sinergismo para *Bifidobacterium animalis*, ausência de sinergismo sobre *S. dysenteriae* e 33 (49%) possuíam efeito inibidor sobre este patógeno. Efetuou-se a identificação de 10 isolados através de provas bioquímicas verificando-se a presença de *L. paracasei subsp paracasei* no queijo da Ilha de S. Jorge e de *L. rhamnosus*, *L.buchneri* e *L. curvatus* no queijo Parmesão.

A ação biótica dos extratos aquosos dos queijos sobre as estirpes de desafio foi também avaliada, tendo o Queijo da Ilha de São Jorge apresentado maior ação antagonista sobre *Shigella sp.* Em ambos os casos houve sinergismo na presença de *B. animalis* e *E. faecium*. No queijo da Ilha de São Jorge parecem ocorrer agentes com potencial probiótico em maior número do que no queijo Parmesão. Propõem-se estudos mais aprofundados que proporcionem conhecimento adicional sobre o potencial valor funcional deste queijo tradicional português.

Palavras-chave: microbiota, queijo, probiótico, *Lactobacillus*

## Probiotic potential of Ilha de São Jorge and Parmigiano cheeses

### Abstract

Parmigiano cheese has been officially recognized as having health promoting properties. With the purpose to initiate the evaluation of the probiotic potential of the Ilha de São Jorge cheese comparative studies have been made between the Italian and the Portuguese cheeses holding similar characteristics.

Both cheese's lactic microorganisms were generally characterized and their direct biotic interaction was studied regarding three bacterial agents found in the human intestine: a pathogen (*Shigella dysenteriae*), a commensal (*Enterococcus faecium*) and a beneficial one (*Bifidobacterium animalis subsp lactis*).

From the 225 autochthone isolates, 67 had synergetic behavior with *B. animalis*, no synergetic behavior with *S. dysenteriae* and 33 (49%) had antagonistic activity against the pathogen. Biochemical tests were used to identify 10 isolates, *L. paracasei subsp paracasei* was found in the Ilha de São Jorge cheese and *L. rhamnosus*, *L. buchneri* and *L. curvatus* in the Parmigiano cheese.

The evaluation of the cheeses water soluble extracts interaction with the challenge bacteria showed an antagonistic activity of the São Jorge's against *Shigella sp.* Both cheeses extracts had a synergetic effect with *B. animalis* and *E. faecium*.

São Jorge's cheese appeared to have a higher number of probiotic agents than those found in the Parmigiano cheese. In order to understand the functional potential of this traditional Portuguese cheese, further studies must be pursued.

Keywords : microbiota, cheese, probiotic, *Lactobacillus*

## Índice

Capítulo I - Caracterização geral dos agentes probióticos do queijo.....	1
1- Introdução.....	1
1.1 - O Queijo.....	2
1.1.1 - Leites .....	3
1.1.2 - Coalhada.....	3
1.1.3 - Período de cura - Microrganismos "starter" e "non starter" .....	4
1.1.4 - Avanços tecnológicos na redução do período de cura .....	7
1.1.5 - Queijo da Ilha de São Jorge.....	8
1.1.6 - "Parmigiano Reggiano".....	9
1.2 - Probióticos.....	10
1.2.1 - A microbiota intestinal humana .....	10
1.2.2 - Caracterização dos Probióticos.....	11
1.3 - Probióticos e o queijo.....	15
1.4 - Métodos para a detecção de efeito probiótico de microrganismos.....	16
1.4.1 - Resistência à acidez gástrica e sais biliares.....	16
1.4.2 - Atividade antimicrobiana.....	17
1.4.3 - Resistência a antibióticos.....	18
1.4.4 - Adesão.....	18
Capítulo II - Detecção de agentes microbianos dos queijos da Ilha de S. Jorge e "Parmigiano Reggiano" com efeitos bióticos sobre algumas bactérias do intestino humano (trabalho experimental) .....	20
2.1 - Objetivos.....	20
2.2 - Material e Métodos.....	20
2.2.1 - Amostragem.....	20
2.2.2 - Extratos aquosos dos queijos e avaliação da respetiva atividade biológica.....	21
2.2.3 - Isolamento de bactérias existentes nos queijos da Ilha de S. Jorge e "Parmigiano Reggiano" .....	22
2.2.4 - Pesquisa de atividade inibidora nas bactérias isoladas dos queijos da Ilha de S. Jorge e "Parmigiano Reggiano".....	22
2.2.5 - Identidade das estirpes selecionadas.....	23
2.3 - Resultados e Discussão.....	25
2.3.1 - Efeitos bióticos dos extratos aquosos dos queijos da Ilha de S. Jorge e "Parmigiano Reggiano" .....	26
2.3.2 - Atividade inibidora das bactérias selecionadas.....	29
2.3.3 - Identidade das estirpes selecionadas.....	33
2.3.3.1 - Isolados identificados no Queijo da Ilha de S. Jorge.....	37
2.3.3.2 - Isolados identificados no "Parmigiano Reggiano".....	39

Capítulo III - Conclusões gerais .....	43
Bibliografia.....	46
Anexos .....	58

## Índice de Figuras

Figura 2.3.1.1 - Halos de inibição observados para <i>S. dysenteriae</i> com extrato de queijo da Ilha de São Jorge filtrado .....	28
Figura 2.3.2.1 - Halos de inibição observados com estirpes bacterianas isoladas do queijo da Ilha de S. Jorge desafiadas por <i>S. dysenteriae</i> .....	31
Figura 2.3.2.2 - Sinergismo entre um isolado e <i>Bifidobacterium sp</i> .....	31
Figura 2.3.2.3 - Efeito inibidor e sinérgico secundário de um isolado de queijo da Ilha de S. Jorge e <i>Bifidobacterium sp</i> .....	31
Figura 2.3.2.4 - Efeito inibidor de um isolado de Queijo da Ilha de S. Jorge sobre <i>Bifidobacterium sp</i> .....	32
Figura 2.3.3.1 - Produção de gás em caldo MRS incubado a 37°C.....	35
Figura 2.3.3.2 - Produção de ácido e de gás em caldo de fermentação de glucose.....	35
Figura 2.3.3.3 - Leitura de API 50CHL de um dos isolados após 48h de incubação a 37°C.....	37

## Índice de Quadros

Quadro 1.1.1.1 - Composição geral do leite de algumas espécies produtoras.....	3
Quadro 1.2.2.1 - Exemplos de estirpes probióticas no mercado .....	14
Quadro 2.3.1.1.- Positividade (%) para atividades inibidoras e sinérgicas de <i>Shigella dysenteriae</i> , <i>Enterococcus faecium</i> e <i>Bifidobacterium animalis ssp lactis</i> (BB12) reveladas pelos extratos de queijo centrifugados .....	27
Quadro 2.3.1.2.- Frequência de interações bióticas dos extratos de queijo filtrados com <i>S. dysenteriae</i> , <i>E. faecium</i> e <i>Bifidobacterium animalis ssp lactis</i> .....	28
Quadro 2.3.2.1 - Condições de crescimento e número de isolados bacterianos dos Queijos da Ilha de São Jorge e Parmigiano Reggiano .....	30
Quadro 2.3.3.1 - Atividade inibidora de estirpes selecionadas na presença de <i>Shigella dysenteriae</i> , <i>Enterococcus faecium</i> e <i>Bifidobacterium animalis</i> .....	34
Quadro 2.3.3.2 - Desenvolvimento dos isolados selecionadas em caldo de MRS a 45°C, 15°C, 4 % NaCl e 6,5% NaCl .....	35
Quadro 2.3.3.3 - Resultados de API 50 CHL dos isolados selecionados a partir de isolamentos obtidos dos queijos Parmesão e da Ilha de S. Jorge.....	36

## Lista de Abreviaturas

ATCC.....	“American Type Culture Collection”
aw.....	Atividade da água
BAL.....	Bactérias ácido lácticas
BCRC.....	“Bioresource Collection and Research Center”
CLA.....	“Conjugated Linoleic Acids”
CIM.....	Concentração inibitória mínima
DGGE.....	“Denaturing Gradient Gel Electrophoresis”
DHPLC.....	“Denaturing High Performance Liquid Chromatography”
RAPD.....	“Random Amplified Polymorphic DNA”
DOP.....	Denominação de Origem Protegida
EFSA.....	“European Food Safety Authority”
ETG.....	Especialidade Tradicional Garantida
FAO.....	“Food and Agriculture Organization of the United Nations”
FISH.....	“Fluorescence In Situ Hybridisation”
GABA.....	“Gamma-aminobutyric acid”
IBD.....	“Inflammatory Bowel Disease”
IBS.....	“Irritable Bowel Syndrome”
IgA.....	Imunoglobulina A
IgG.....	Imunoglobulina G
IGP.....	Indicação de Origem Protegida
IL.....	Interleucina
INRAN.....	“Istituto Nazionale di ricerca per gli alimenti e nutrizione”
LH-PCR.....	“Length Heterogeneity Polymerase Chain Reaction”
MH.....	Mueller-Hinton
MRS.....	Mann, Rogosa, Sharpe
MTCC.....	“Microbial Type Culture Collection”
NCTC.....	“National Collection of Type Cultures”
PBS.....	“Phosphate buffered saline”
PCR.....	“Polymerase Chain Reaction”
QPS.....	“Qualified Presumption of Safety”
RFLP.....	“Restriction Fragment Length Polymorphisms”
TNF- $\alpha$ .....	“Tumor Necrosis factor alpha”
TTGE.....	“Temporal Temperature Gradient Electrophoresis”
UE.....	União Europeia
UFC.....	Unidade Formadora de Colónia



WGO..... “World Gastroenterology Organisation”  
WHO..... “World Health Organization”

## **Capítulo I - Caracterização geral dos agentes probióticos do queijo**

### **1 - Introdução**

Nas sociedades modernas regista-se uma tendência para valorizar os aspectos nutricionais e nutracêuticos dos géneros alimentícios, nomeadamente quanto aos benefícios que deles se podem obter para a melhoria da saúde.

Esta ideia cresce como um contraponto do facto de, nas últimas décadas, ter aumentado bastante a incidência das doenças que resultam dos excessos alimentares, como: a obesidade, a hipercolesterolemia, a hipertensão, os acidentes cardiovasculares e alergias alimentares. A tomada de consciência de que estes problemas de saúde podem ser evitados através da prática de uma dieta saudável, tem feito crescer a procura de alimentos funcionais e relevantes para a prevenção das referidas doenças da civilização.

Neste sentido, também a oferta de géneros alimentícios tem vindo a evoluir, sendo disponibilizado um número crescente de produtos funcionais que, para além do seu valor nutricional, veiculam elementos químicos e físicos que melhoram o estado de saúde, ou o bem-estar, e/ou reduzem o risco de doença (Ried, 2004). Por isso, as estratégias de comercialização do mercado alimentar direccionam hoje sobretudo para o desenvolvimento de novos produtos funcionais. Não buscam, contudo, enaltecer os benefícios que já se encontram nos produtos tradicionais regularmente incluídos na dieta diária (Ried, 2004), como por exemplo os que existem nalguns derivados lácteos como os queijos e os leites fermentados.

O consumo de queijo constitui um hábito quase universal. É cada vez maior o interesse pelos microrganismos dos queijos e pela forma como interagem com a microbiota intestinal humana. O queijo “Parmigiano Reggiano” foi definido como um alimento “funcional” pelo “Istituto Nazionale di ricerca per gli alimenti e nutrizione” [INRAN] (2008) por possuir características que o tornam benéfico para a saúde humana. Por outro lado, trabalhos científicos (Gala et al., 2008; Neviani, Lindner, Bernini, & Gatti, 2009) que procuraram descrever a microbiota deste queijo de cura prolongada, identificaram microrganismos que são semelhantes a alguns probióticos conhecidos (World Gastroenterology Organisation [WGO], 2008).

O presente trabalho pretende averiguar se as microbiotas dos queijos da Ilha da São Jorge, um queijo tradicional português de cura longa, e do “Parmigiano Reggiano” apresentam alguma característica que possa ter, eventualmente, um potencial benéfico sobre estirpes que se encontraram na microbiota intestinal humana. Deste modo o objetivo principal deste trabalho foi averiguar se existem caminhos para a valorização de produtos tradicionais através da descrição de características intrínsecas do alimento e o seu potencial efeito sobre a saúde do consumidor.

## 1.1 - O Queijo

O “queijo” é um alimento lácteo coagulado e por vezes maturado, que é produzido por todo o mundo, apresentando grande variabilidade de características sensoriais (Fox & McSweeney, 2004). Citando Sandine & Elliker (1970), Beresford, Fitzsimons, Brennan e Cogan (2001) afirmam que existe pelo menos um milhar de tipos de queijo em todo o mundo. De facto, segundo os dados da União Europeia (2012) podem-se contabilizar, até ao momento, 203 queijos registados com estatuto de “Denominação de Origem Protegida” (DOP), “Indicação de Origem Protegida” (IGP) ou “Especialidade Tradicional Garantida” (ETG) por toda a União. No território português encontram-se protegidos queijos de 12 origens diferentes e modos de produção específicos.

Vários autores mencionam que o queijo surgiu como uma forma de preservar excedentes de leite, um produto facilmente perecível, e prevenir a sua degradação (Beresford et al., 2001; Fox & McSweeney, 2004; Cruz, Buriti, Souza, Faria & Saad, 2009). O queijo é o produto lácteo para o qual é destinada a maior quantidade do leite de vaca produzida atualmente na UE. Em 2010 produziram-se 136,1 milhões de toneladas de leite, das quais 36,1% foram convertidas em queijo, 28,7% em manteiga e 11,5% em leite de bebida (União Europeia, 2011).

As técnicas de produção queijeira podem ser classificadas em dois grandes grupos: a coagulação ácida que dá origem a produtos frescos prontos a consumir, tais como o queijo fresco, queijo tipo Cottage, queijo creme; e a coagulação enzimática, utilizada no processo de fabrico da maioria dos queijos, aproximadamente 75%, que implica um período de cura que pode variar entre três semanas (Mozarella) a dois anos (Parmesão) (Fox, Guinee, Cogan & Mcsweeney, 2000; Beresford et al., 2001; Cruz et al., 2009). A consistência tem sido a característica sensorial mais utilizada na classificação dos queijos, variando de acordo com o teor de humidade do alimento: pasta dura, semi-dura ou mole (Fox & McSweeney, 2004). Apesar de ser uma classificação arbitrária, permite associar os queijos de acordo com a sua sensação de consistência ou dureza (Farkye, 2004 citado por Cruz et al., 2009). Para além da classificação acima mencionada, podem também ser agrupados de acordo com a espécie leiteira, o rácio humidade/proteína, a temperatura de cozedura, a microbiota de cura (Fox & McSweeney, 2004) e a forma.

A produção via coagulação enzimática possui um conjunto de etapas que são comuns à maioria dos queijos: a formação de coalhada, o dessoramento, a acidificação da massa, a adição de sal e o período de cura (Beresford et al., 2001). A variabilidade existente depende muito do processo utilizado e da interação dos ingredientes misturados (tipos de leite, coalho, microrganismos ou cultura “starter” e sal). O modo como se procede ao aquecimento e as técnicas de manipulação da coalhada constituem passos importantes para atingir as características típicas de cada variedade de queijo; a microbiota que se encontra presente e

atua durante o período de cura, desempenha um papel crítico no desenvolvimento destas características. (Fox et al., 2000; Beresford et al., 2001; Cruz et al., 2009)

### 1.1.1 - Leites

Os leites são a matéria-prima básica essencial para a produção de queijos. É sobre ela que recai a ação enzimática coagulante, sendo um fator determinante sobre as características finais do produto. A sua composição e microbiologia são influenciadas pela espécie leiteira (Quadro 1.1.1.1), pelo período de lactação, pela dieta do animal, pela zona geográfica, pela sazonalidade e pela técnica de ordenha. O leite de vaca possui, de longe, maior relevância neste sector; no entanto, o de cabra e de ovelha estão intrinsecamente associados à produção de queijos tradicionais e de leites fermentados nas regiões da Bacia Mediterrânea e Índia (Fox et al., 2000). Das fêmeas leiteiras com menor expressão mundial e de práticas tradicionais locais, destacam-se a rena no Norte da Europa, a camela, a égua e a iaque no Norte de África e Ásia (Potes, 2000).

Quadro 1.1.1.1 - Composição geral do leite de algumas espécies produtoras (Fox et al., 2000)

Espécie	Sólidos totais	% Gordura	% Proteína	% Lactose	Cinza
Vaca	12,7	3,7	3,4	4,8	0,7
Ovelha	19,3	7,4	4,5	4,8	1
Cabra	12,3	4,5	2,9	4,1	0,8

### 1.1.2 - Coalhada

O passo essencial para o início da transformação de leite em queijo é a formação da coalhada. Pensa-se que a descoberta deste fenómeno, a coagulação do leite, resultou da conjugação aleatória de múltiplos fatores. De acordo com Fox et al.(2000), antes da criação da cerâmica, no período 5000 a.C., o armazenamento do leite era realizado em peles ou em estômagos de animais abatidos. Ao não ser ingerido de imediato e deixado em repouso, o leite sofria a ação das bactérias e das enzimas gástricas que o convertiam numa massa sólida e numa aguadilha refrescante adequada ao consumo. Este terá sido o primeiro contacto humano com a coalhada e o soro do leite.

Atualmente, o processo da formação da coalhada é induzido pela acidificação do leite através da ação bacteriana, da plasmina presente no leite ou dos coalhos de origem animal, vegetal ou das preparações enzimáticas conhecidas que são adicionados (Sousa, Ardö, & McSweeney, 2001).

O coalho animal, a substância coagulante com maior número de referências na literatura, é retirado do abomaso de pequenos ruminantes lactentes. No entanto, o coalho de monogástricos também pode ser utilizado. No mundo vegetal são várias as fontes de

coagulantes do leite, sendo o cardo (*Cynara cardunculus*) o que mais tem sido utilizado nos vários séculos de produção tradicional de queijo da Península Ibérica (Macedo, Malcata, & Oliveira, 1993). Nos coalhos estão presentes enzimas, exemplo da quimosina e da cardosina, que atuam sobre a alfa e beta caseínas do leite desdobrando-as em péptidos de cadeia mais curta (Fox et al., 2000; Sousa et al., 2001). A paracaseína resultante possui zonas C-terminais hidrofílicas e de elevada carga eléctrica, que na presença de cálcio a temperaturas superiores a 20°C, se reorganizam numa trama proteica de elevada viscosidade capaz de reter a matéria sólida do leite (Fox et al., 2000). Este gel, se não for perturbado, mantém-se estável mas após ação mecânica dá-se uma retração da coalhada provocando a libertação do soro. O dessoramento da coalhada depende da temperatura, do pH e do calibre do instrumento de corte utilizado. Cada um destes pontos, por sua vez, depende da arte do queijeiro, mas de forma geral, se o corte da coalhada for pouco intenso leva a uma perda de água proporcional, aumentando quando o corte é mais miúdo. As temperaturas de amplitude entre 30 e 55°C promovem uma intensidade crescente de dessoramento e o mesmo acontece quanto maior for a acidez da coalhada, normalmente entre pH 6,6 e 6,3 (Fox et al., 2000).

### **1.1.3 - Período de cura - Microrganismos “starter” e “non starter”**

A cura do queijo é um processo complexo com intervenção de uma grande variedade microbiana e diversidade de reações bioquímicas. Os microrganismos presentes ao longo da cura podem ser classificados em culturas de arranque ou “starters” de bactérias produtoras de ácido láctico (BAL), culturas secundárias de BAL (“non starter”), bactérias produtoras de ácido propiónico, inóculo bacteriano, bolores e/ou leveduras. Entre os vários fatores físicos que influenciam o desenvolvimento microbiano ao longo do período de cura são apontados a atividade da água ( $a_w$ ), o sal, o pH, a temperatura, o potencial redox (Lane, Fox, Walsh, Folkertsma & McSweeney, 1997; Di Cagno, De Angelis, Limitone, Fox & Gobbetti, 2006), nalguns casos nitratos e cloretos e a presença de bacteriocinas produzidas por alguns “starters”. Outros fatores que podem influenciar a evolução da população bacteriana são a produção de ácidos orgânicos (láctico, propiónico e acético), peróxido de hidrogénio e a competição por nutrientes (Beresford et al., 2001).

As BAL de arranque são responsáveis pela acidificação da massa através da produção de ácido láctico resultante da fermentação da lactose. Participam também na proteólise com a sua ação enzimática e promovem a libertação de aminoácidos que consequentemente são transformados em compostos significativos para as características sensoriais do produto final (Dabour, LaPointe, Benhamou, Fliss & Kheadr, 2005; Georgieva et al., 2009). A cultura bacteriana pode ser adicionada de forma programada no início da produção queijeira, por exemplo a adição de soro do dia anterior, ou ser inserida através de uma contaminação

natural de leite no momento da recolha ou durante o processo de fabrico (processo empírico). A produção artesanal feita de leite cru sem adição de cultura de arranque, é um ótimo exemplo desta realidade. As culturas de arranque são compostas geralmente por bactérias dos géneros *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* e *Enterococcus* e atingem uma densidade de  $10^8$  unidades formadoras de colónias (UFC) por grama nas primeiras horas de produção (Lynch, Muir, Banks, McSweeney & Fox, 1999; Beresford et al., 2001). São utilizadas estirpes mesófilas ou termófilas dependendo das temperaturas de aquecimento atingidas durante o processo de trabalho da coalhada. Nos queijos tipo Cheddar, Gouda, Edam, Blue e Camembert utilizam-se BAL de arranque mesófilas, enquanto que os queijos de pasta dura como o Emmental, Gruyère e Parmesão, por atingirem temperaturas próximas dos 50-55°C durante o aquecimento, selecionam somente as bactérias termófilas ou termodúricas (Beresford et al., 2001).

O uso de misturas bacterianas conhecidas é comum no fabrico industrial de queijos. Um exemplo internacional é o do queijo Cheddar que permite a obtenção de queijos com características mais homogêneas ao longo de toda a produção (Crow, Curry, & Hayes, 2001).

Vários estudos sobre a diversidade microbiana presente nos queijos apontam para uma maior variedade nos de produção artesanal em detrimento da produção industrial, independentemente do tipo de queijo avaliado. É sugerido que a principal razão para esta realidade seja o uso de leite cru e da existência de “starters” desconhecidos (Quigley et al., 2011). As culturas mesófilas, indefinidas ou mistas, são constituídas predominantemente por *Lactococcus spp*, mais especificamente *Lactococcus lactis subsp cremoris* e *Lc. lactis subsp lactis* (Lodics & Steenson, 1993), podem também estar presentes *Leuconostoc spp* (Fox et al., 2000). As culturas de arranque termófilas podem possuir na sua composição uma única estirpe ou mais do que uma. Entre elas estão referidas *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp delbrueckii*, *L. delbrueckii subsp bulgaricus*, *L. delbrueckii subsp lactis* e *L. helveticus* (Beresford et al., 2001).

Um dos principais objetivos da cultura de arranque é proporcionar um ambiente adequado ao desenvolvimento da microbiota secundária, através da ação enzimática das BAL e das enzimas da coalhada. O controlo da temperatura e da relação sal/humidade durante o fabrico do queijo garante a atividade das bactérias de arranque, atingindo-se assim o pH ideal (Fox et al, 2000; Fox & Wallace, 1997 citado por Beresford et al, 2001).

As culturas de arranque aumentam de densidade durante o “trabalho da coalhada” e sofrem um declínio acentuado no início do período de cura. Desta forma esta biomassa contribui para o potencial biocatalítico das reações ao longo da cura através da autólise das células bacterianas. Esta ação autolítica pode ser desencadeada pela presença de enzimas, pela concentração de sal na mistura e pela variação das condições durante o fabrico tais como as elevadas temperaturas de cozedura. Caso o número de células de arranque se mantiver

elevado durante um longo período de tempo, podem surgir defeitos nas características sensoriais. Os precursores dos compostos necessários para a obtenção das características adequadas e o processo proteolítico aumentam de forma significativa após a autólise das BAL de arranque. Por outro lado, estas são responsáveis pela metabolização da lactose e consumo do oxigénio presente na massa da coalhada (Crow et al., 1995).

A microbiota BAL “non starter” é constituída por lactobacilos mesófilos e *Pediococcus spp.*, presentes na maioria dos queijos curados. Não pertencem à cultura de arranque pois, em regra, não são capazes de se multiplicar no leite e não produzem uma quantidade de ácido que contribua para a acidificação inicial do queijo (Cogan et al., 1997). Estes lactobacilos são maioritariamente heterofermentativos facultativos. De facto, estudos efetuados em vários queijos, apontam para uma predominância frequente de *Lactobacillus casei* e *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. curvatus*, *Pediococcus acidilactici* e *P. pentosaceus*. Também se encontram lactobacilos heterofermentativos obrigatórios como *L. fermentum* e *L. brevis*, porém são menos frequentes (Beresford et al., 2001).

A fonte energética de carbono ainda não é clara, visto a lactose ser escassa no momento de crescimento exponencial das BAL “non starter”. Estas podem transformar o isómero L-lactato em isómero D, como também apresentam capacidade de metabolizar o citrato, mas estes metabolitos não são vistos como a fonte principal de carbono mais relevante. Thomas (1987) demonstrou que a microbiota evolui na presença dos produtos libertados pelas BAL de arranque autolisadas pela atividade hidrolítica das suas próprias enzimas. Por outro lado, Rapposch, Eliskases-Lochner e Ginzinger (1999) evidenciaram que a ribose da parede celular das culturas de arranque lisadas também foi utilizada como substrato pelos lactobacilos heterofermentativos “non starter”. Os lactobacilos mesófilos possuem atividade glicolisehidrolase e em sistemas modelo possuem capacidade de metabolizar os açúcares das glicoproteínas da membrana e glóbulos de gordura presentes no leite. Este dado é apoiado por Fenelon, O'Connor e Guinee (2000), que demonstraram que a taxa de multiplicação das bactérias “non starter” é mais reduzida com a diminuição de gordura do leite.

As bactérias “non starter” encontram-se em elevada densidade tanto nos queijos produzidos com leite cru como nos de leite pasteurizado. O número de UFC na pasta no final do período de cura dos queijos de leite cru,  $10^8$  UFC/g, é ligeiramente superior ao que se regista nos queijos obtidos de leite pasteurizado,  $10^6$  UFC/g. Coloca-se a hipótese da microbiota BAL “non starter” ser veiculada pelo leite cru, quando não submetido a tratamento térmico, enquanto no leite pasteurizado poderá advir de uma contaminação posterior à pasteurização ou ocorrer a proliferação de bactérias que tenham sobrevivido à pasteurização (termodúricas) (Beuvier et al., 1997).

As interações da microbiota dos queijos são complexas e relativamente desconhecidas, contudo alguns estudos sugerem que *L. casei*, *L. rhamnosus* e *L. plantarum* inibem o desenvolvimento de bactérias ácido propiônicas e *Enterococcus* (Jimeno, Lazaro & Sollberger, 1995; Beresford et al., 2001) através da competição por nutrientes disponíveis no substrato.

O papel destas bactérias durante a cura do queijo não é completamente compreendido mas a sua presença influencia as características finais do produto (Steele, Budinich, Cai, Curtis, & Broadbent, 2006). Num estudo experimental em Cheddar a utilização de *L. paracasei subsp paracasei* e de *L. plantarum* como cultura adicionada levou a um ligeiro aumento da proteólise e a uma alteração da intensidade do “flavor” e do aroma que sugerem aceleração do processo de cura (Lynch et al., 1999).

#### **1.1.4 - Avanços tecnológicos na redução do período de cura**

A etapa de cura de um queijo é ainda um processo pouco controlado apesar do crescente conhecimento sobre a sua microbiota e bioquímica. Não obstante, o custo de produção e o desejo de encurtar o tempo de permanência dos queijos nas salas de cura têm servido como incentivos económicos e tecnológicos para acelerar este fenómeno, sem provocar alteração nas características sensoriais e na textura final no queijo (Law, 2001).

A proteólise parece ser a principal reação na cura da maioria dos queijos, por outro lado a lipólise e a oxidação dos ácidos gordos são também relevantes para a produção de queijos “Azúis” e de alguns queijos italianos. Sendo assim, as técnicas de redução do período de cura visam acelerar as reações de proteólise e, em alguns casos, as de lipólise.

Os métodos sugeridos com esse fim são o aumento das temperaturas de cura, a adição de enzimas exógenas, o uso de bactérias modificadas química ou fisicamente, a adição de culturas de arranque geneticamente modificadas, o uso de culturas adicionadas para cura dirigida, o uso de pastas de queijo ou pasta de queijo modificado enzimaticamente (Fox et al., 2000; Law, 2001).

De todos os métodos sugeridos a elevação da temperatura parece ser uma forma eficiente, simples e económica de promover a aceleração da cura no queijo Cheddar (Ong & Shah, 2009). Este método possui como desvantagem uma influência desigual sobre a proteólise e as outras reações bioquímicas de cura que podem potenciar características sensoriais anormais (Fox et al., 2000). Numa experiência realizada com queijo Cheddar aumentou-se a temperatura de cura de 6°C para 13°C provocando uma aceleração de 50% no processo de cura (Fox et al., 1996). O queijo Manchego submetido a uma temperatura superior a 12 °C acelerou com sucesso o seu período de cura (Gaya, Medina, Rodríguez-Marin, & Nuñez, 1990). No entanto esta prática não pode ser aplicada a outras variedades que utilizem temperaturas elevadas no período de cura.



O uso de culturas de arranque selecionadas e/ou geneticamente modificadas apresenta um grande potencial. Na escolha de estirpes de arranque, em particular *Lactococcus* e *Lactobacillus*, é necessário ter em consideração a resistência a fagos, a capacidade de desenvolvimento e a de produção de ácido às temperaturas de fabrico, a compatibilidade interestirpes com capacidade de autólise e de produção de bacteriocinas que proporcionem a lise das outras bactérias de arranque, proporcionando a libertação das enzimas intracelulares (exopeptidases, esterases, fosfatases).

Para a aceleração do prazo de cura é essencial identificar os compostos chave que influenciam a percepção sávida. Até hoje foram identificados 400 compostos que podem participar no sabor e no aroma dos queijos mas ainda não foi efetuada uma descrição concisa do “flavor” dos queijos (Fox et al., 2000) .

#### **1.1.5 - Queijo da Ilha de São Jorge**

O queijo da Ilha de São Jorge produzido na ilha homónima do arquipélago dos Açores, possui um “flavor” limpo e picante que se vai acentuando com a idade (União das Cooperativas Agrícolas de Lacticínio de São Jorge). Pela especificidade e singularidade deste queijo, cujas características estão intrinsecamente associadas à zona geográfica do seu local de produção, foi-lhe outorgado o estatuto de “Denominação de Origem Protegida” (DOP). É um produto frequentemente colocado nos mercados externos com uma importante quota de exportação para países norte americanos como os Estados Unidos e o Canadá.

O queijo de São Jorge, produzido a partir do leite de vaca cru, é um queijo curado de pasta amarelada, dura ou semidura, de massa firme com pequenos olhos distribuídos irregularmente por todo o seu interior. Trata-se de um queijo em forma de “roda” que pode pesar entre os 8 e 12 kg. O período de maturação mínimo é de 3-4 meses mas o limite oficial de cura consideram-se os 6 e os 7 meses.

Para produzir queijo da Ilha de S. Jorge usa-se leite de vaca cru, inteiro, que é inicialmente filtrado e colocado em cubas, sendo submetido a um aquecimento até 30°C (temperatura de coagulação). Para se iniciar a acidificação do leite e a formação da coalhada, é adicionado o coalho animal de vitelo lactente e soro da produção do dia anterior (inóculo bacteriano natural). A coalhada fica formada ao fim de cerca de uma hora seguindo-se de imediato o corte com as liras para promover o dessoramento da massa. O “trabalho da coalhada” (retração) é auxiliado com um aumento da temperatura a 35-36°C. De seguida procede-se à drenagem do soro e à adição manual de sal. A coalhada é remexida manualmente de forma a incorporar o sal e procede-se ao encinchamento nas respetivas formas. A pasta encinchada é submetida a uma prensagem durante 48h para permitir a saída do soro (Kongo, Gomes, Malcata, & McSweeney, 2009). Segue-se um período de secagem durante 4 dias a 16°C. Antes da colocação na câmara de cura a 19 °C, os queijos são revestidos por

uma camada de parafina. Ao longo do período de maturação os queijos são virados com regularidade. As características do modo e local de produção estão estabelecidas no Decreto Regulamentar Regional n.º 24/86/A, de 9 de Julho.

No final do seu período de cura, o queijo da Ilha de São Jorge possui  $10^7$ - $10^8$  UFC/g de microrganismos totais, dos quais foram identificados *Lactobacillus*, *Lactococcus* e *Enterococcus*. No entanto, na coalhada fresca também foram identificadas bactérias pertencentes aos géneros *Leuconostoc* e *Pediococcus*. Alguns bolores e leveduras também intervêm na cura deste queijo, atingindo um máximo aos 90 dias de maturação com  $10^5$ - $10^6$  UFC/g (Kongo et al., 2009). As bactérias isoladas e identificadas, através de métodos bioquímicos e genéticos, com maior predominância no queijo da Ilha foram *L. paracasei*, *L. rhamnosus*, *E. faecalis* e *E. faecium*. No entanto, foram detectadas maior número de colónias de *L. paracasei* ao longo de todo o período de cura (Kongo, Ho, Malcata, & Wiedmann, 2007).

#### 1.1.6 - “Parmigiano Reggiano”

O “Parmigiano Reggiano”, também conhecido por queijo Parmesão, é produzido no Norte de Itália nas regiões de Parma, Reggio Emilia, Modena, Bolonha e Mântua. Existem relatos da produção deste queijo desde a época medieval por volta do séc. XII, sendo, por isso, um produto de enorme tradição e típico da região (“Conzorzio Parmigiano Reggiano”).

No fabrico deste queijo é usado leite de vaca, parcialmente desnatado durante a noite (repouso), e leite inteiro da manhã seguinte. A mistura é previamente aquecida a 22°C sendo de seguida adicionado coalho de vitelo e soro da produção anterior numa proporção de 28-30g/L. O pH da mistura deve atingir os 6,2 a 6,3. Quinze minutos após a adição do coalho inicia-se a coagulação, a massa é cortada e aquecida a uma temperatura gradualmente crescente até aos 42-44 °C e rapidamente até atingir os 55°C durante 10-15 minutos. Deixa-se a coalhada a repousar coberta pelo soro durante 40-60 min. Após este período procede-se à filtração do soro envolvendo a coalhada com um pano de linho para posteriormente ser colocada numa forma de madeira. A coalhada encinchada é mantida durante 3 dias a 20 °C sendo virada com frequência. Uma particularidade deste queijo é a passagem pela salmoura durante 24 dias, a 16-17 °C, o que lhe permite absorver 15-18 g NaCl/kg e reduzir o seu peso 4 %. No período subsequente de cura, o queijo é mantido durante pelo menos 12 meses, e por vezes até 24 meses, a 16-18 °C num ambiente com 85 % de humidade (Coppola et al., 1997). No final da cura apresenta uma forma de roda, de aproximadamente 30 kg, de pasta dura e de cor amarelada.

A textura do queijo é granulada e fina, apresentando facilidade em lascar. A pasta é dura e seca, com um sabor equilibrado entre o doce, o salgado e o ácido (Zannoni, 2010).

O “Parmigiano Reggiano” possui também o estatuto DOP, sendo um dos queijos que é mais conhecido internacionalmente. Talvez, por isso, existem vários estudos microbiológicos e bioquímicos sobre este queijo.

No soro da coalhada já foram identificadas várias BAL como *Lactobacillus helveticus*, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*, *L. delbrueckii subsp. lactis*, *L. fermentum* e *Streptococcus thermophilus* (Beresford et al., 2001; Rossetti, Caminati, Zago & Giraffa, 2009; Giraffa, Chanishvili & Widyastuti, 2010; Quigley et al., 2011; Morandi & Brasca, 2012). No entanto a composição precisa da microbiota destes soros não é adequadamente controlada.

A microbiota “non starter” presente nesse queijo é dominada pelas BAL *L. paracasei*, *L. rhamnosus* e *P. acidilactici* (Gala et al., 2008; Neviani et al., 2009). Durante o período de cura a densidade destas bactérias varia de  $10^8$  UFC/g aos cinco meses, a  $10^4$  UFC/g após os 24 meses de cura (Coppola et al., 1997; Beresford et al., 2001).

## 1.2 - Probióticos

A utilização de probióticos em Medicina Veterinária é uma prática sistemática como técnica de manejo sanitário, sobretudo na produção intensiva de aves e de suínos.

A utilização de preparados comerciais contendo *Lactobacillus*, o “Broilact” ou o “Avigard” são práticas muito comuns nos sistemas de multiplicação de aves, no momento da eclosão dos pintos nos aviários de multiplicação.

Também a utilização de conteúdos cecais de aves adultas saudáveis é utilizada para os mesmos fins na indústria de produção de aves do dia (pintos, patos, codornizes e perús).

A adaptação desta experiência acumulada ao longo das três últimas décadas como recurso para prevenir as infecções intestinais nas aves e nos suínos (Salmonelose, Colibacilose, Campylobacteroses e Clostridioses), parece não ter uma extensão equivalente na proteção das infecções intestinais humanas.

### 1.2.1 - A microbiota intestinal humana

O trato gastrointestinal humano contém uma complexa variedade bacteriana que pode ser estimada entre 800 a 1000 espécies diferentes (Hsieh & Versalovic, 2008). É composta predominantemente por bactérias dos gêneros *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Peptostreptococcus*, *Bifidobacterium*, *Ruminococcus*, *Bacillus*, *Fusobacterium*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Enterococcus* e *Enterobacter* (Quigley & Quera, 2006). A colonização intestinal inicia-se logo após o nascimento e é influenciada pelo tipo de parto, pela alimentação, tempo de gestação, hospitalização, ambiente, antibióterapia e doenças maternas (Marques et al., 2010). Durante os primeiros dois anos, a microbiota é dinâmica, com uma predominância de *Bifidobacterium*, *Bacterioides* e *Clostridium* (Marques et al.,

2010). Após os dois anos a microbiota mantém-se relativamente constante até à vida adulta (Quigley & Quera, 2006; Marques et al., 2010). Ao longo do trato digestivo a carga microbiana vai aumentando desde a orofaringe, estômago, intestino delgado culminando no cólon com um valor de  $10^{12}$  UFC/ml. A interação entre a microbiota e o hospedeiro é essencial para a saúde, pois metaboliza açúcares não digeríveis em ácidos gordos de cadeia curta que servem como fonte energética da mucosa do colón, produzem vitaminas, estimulam o sistema imunitário (Quigley & Quera, 2006), previnem o sobrecrecimento das populações de microrganismos patogénicos através da produção de bacteriocinas que as inibem, metabolizam compostos tóxicos em moléculas menos nocivas e produzem moléculas bioativas como os CLA e GABA que possuem um papel de protecção contra doenças como cancro, a obesidade e os problemas cardiovasculares. Esta complementaridade entre bactérias e hospedeiro influencia o desenvolvimento das respostas imunitárias. Por sua vez, o sistema imunitário modela a composição microbiana (Marques et al., 2010). A maior evidência desta relação é a observação de animais “*Germ free*”, cuja ausência de microbiota intestinal leva a um menor desenvolvimento das placas de Peyer, da variedade celular na lâmina própria e da vascularização da mucosa. Por outro lado, as vilosidades são longas e uniformes, com uma atividade enzimática reduzida e produção pouco evidente de citocinas (Quigley & Quera, 2006).

A colonização do intestino humano influencia o estado de saúde do hospedeiro. Desta forma, a possibilidade de influenciar a sua composição através de ingestão de bactérias ou probióticos, é uma estratégia que pode contribuir para a prevenção ou tratamento de doenças intestinais e sistémicas (Marques et al., 2010).

### **1.2.2 - Caracterização dos Probióticos**

De acordo com a Food and Agriculture Organization [FAO] e a World Health Organization [WHO] (2002) os probióticos são “microrganismos que, consumidos em número suficiente, promovem benefícios para a saúde do hospedeiro”. A origem da palavra probiótico significa “*a favor da vida*”. Contudo, há autores que defendem que a importância da viabilidade dos microrganismos para efeitos probióticos benéficos ainda não está bem estabelecida visto que as células inativadas ou mortas também podem possuir efeito imunológico e promotor da saúde (Lievin-Le Moal, Sarrazin-Davila & Servin, 2007; Ghadimi et al. 2008) .

As bactérias que até agora foram consideradas probióticas pertencem na sua maioria aos géneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* e por outro lado esta designação também foi atribuída às leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e a espécies bacterianas como *E. coli* e *Bacillus*.

Existe alguma apreensão na utilização de *Lactobacillus* pois já foram identificados como agentes patogénicos oportunistas devido à sua resistência antibiótica natural. Bernardeu,

Vernoux, Henri-Dubernet e Gueguen (2008) sugerem que antes da avaliação para aplicação tecnológica devem ser realizadas provas de resistência a antibióticos. No entanto, o risco de infecção provocada por lactobacilos veiculados em produtos lácteos ou fermentados é negligenciável (Borriello et al., 2003) devido à raridade de ocorrência de casos de doença comparando com a frequência de ingestão destes alimentos (Bernardeau, Gueguen, & Vernoux, 2006). Por outro lado a European Food Safety Authority [EFSA] (2005), reportou que as resistências intrínsecas e resistências originárias em mutações cromossômicas apresentam um baixo risco de disseminação horizontal, defendendo que essas estirpes devem ser aceites para o consumo alimentar. Consequentemente, as culturas “starter” de alimentos lácteos não parecem ser uma importante fonte de transferência de genes que codifiquem resistências a antibióticos (Saarela, Mogense, Fondén, Mätö & Mattila-Sandholm, 2000; Bernardeau et al., 2008).

Em 2007, a EFSA atribuiu aos microrganismos utilizados como probióticos o estatuto de “Qualified Presumption of Safety” (QPS) por possuírem uma longa história de utilização aparentemente segura na indústria alimentar.

Vários estudos comprovam o efeito benéfico dos probióticos sobre a saúde, com um vasto leque de ação como: prevenção de diarreias por disbiose causada por antibioterapia ou tratamento de disbiose após uso de antibiótico, alívio de sintomas de intolerância à lactose (Marteau, Vrese, Cellier, & Schrezenmeir, 2001), efeito antiinflamatório em doenças intestinais como Doença inflamatória intestinal (IBD) e Síndrome do cólon irritável (IBS) (Jonkers & Stockbrügger, 2003), prevenção de cancro do colon (Pool-Zobel et al., 1996; Lee et al., 2004), infecções urogenitais (Reid, 2000; Gardiner, Heinemann, Bruce, Beureman & Reid, 2002), controlo de gastrites associadas a *Helicobacter pylori* (Sgouras et al., 2005), estimulação do sistema imunitário, redução de sintomatologia alérgica e do eczema atópico (Marschan et al., 2008). Podem também aliviar sintomas de artrite reumatóide (Malin et al., 1997; Marteau et al., 2001) e de encefalopatia hepática (Solga, 2003); também têm sido referidos alguns trabalhos em que promovem a redução de colesterol plasmático mas os resultados obtidos têm sido muito contraditórios.

A evidência de uma atividade imunoestimuladora, cujo mecanismo é ainda desconhecido (Russell, Ross, Fitzgerald, & Stanton, 2011), tem recebido cada vez mais atenção por parte dos investigadores destes domínios científicos. *L. casei* estimula as células “T Helper” tipo 1, *L. acidophilus* aumenta o número de células mononucleares, enquanto *B. breve* promove a produção de TNF-alfa, IL6 e óxido nítrico pelos macrófagos, a ação das células Kupffer e a produção de anticorpos antirotaviral com isotópos IgA e anticorpos antinfluenza com isotópos IgG (Iannitti & Palmieri, 2010).

Foi, por sua vez, demonstrado que *L. casei* var. *shirota*, em pacientes com cirrose hepática, promove a capacidade fagocitária dos neutrófilos (Stadlbauer et al., 2008) e também alivia a sintomatologia de pacientes com rinite alérgica sazonal (Ivory et al., 2008). A atividade anti-

inflamatória na cavidade oral foi evidente após consumo de pastilhas elásticas inoculadas com *L. reuteri* (Twetman et al., 2009).

Para uma estirpe possuir capacidade probiótica deve ser capaz de persistir no interior do tubo digestivo, multiplicando-se e colonizando o espaço entérico, sem provocar efeitos patogênicos.

Saxelin et al. (2010) realizaram um estudo cujo objetivo era determinar a persistência de quatro estirpes probióticas, *L. rhamnosus* GG, *B. animalis* subsp *lactis* BB12, *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* JS e *L. rhamnosus* LC705 na excreção fecal. Ao longo da experiência as estirpes foram sempre detectadas nas fezes durante o período de ingestão dos microrganismos. No entanto, após o cessar da ingestão destes microrganismos a detecção foi persistente até 21 dias (em média: 17 dias *L. rhamnosus* GG; 7 dias *B. animalis* ssp *lactis* BB12 e *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* JS; e 5 dias *Lb. rhamnosus* LC705). Nesse trabalho foi concluído que, quanto maior for a capacidade de adesão de uma bactéria, maior é a persistência no intestino.

De acordo com Gupta e Garg (2009), para obter alguns dos efeitos probióticos desejados sobre o estado geral do paciente, é recomendada a ingestão diária de  $5 \times 10^9$  UFC durante 5 dias.

Atualmente é possível encontrar no mercado diversos preparados probióticos que são de veiculação alimentar (Quadro 1.2.2.1).

Para o reconhecimento científico do mérito de uma bactéria como agente probiótico, é necessário o apoio de estudos laboratoriais “*in vitro*” e “*in vivo*” que demonstrem a capacidade do microrganismo para percorrer e colonizar o trato gastrointestinal humano, multiplicar-se e estimular de forma positiva a microbiota entérica.

Para estudar o potencial probiótico de estirpes bacterianas, e a sua eventual utilização em alimentos ou suplementos alimentares, a FAO/WHO (2002) criou normas orientadoras que auxiliam na avaliação da segurança, da eficácia, da eficiência e da vigilância (pós-aprovação) destes produtos nomeadamente através de:

- Identificação fenotípica e genotípica da bactéria em estudo e em detalhe do género, da espécie e da estirpe;
- Avaliação da segurança das bactérias utilizando testes “*in vitro*”, ou modelos animais, para estudar possíveis infeções sistémicas, atividades metabólicas prejudiciais, estimulação imunitária excessiva em indivíduos susceptíveis e transferências genéticas;
- Caracterização funcional através de testes “*in vitro*” ou modelo animal, que estudem a resistência à acidez gástrica, a tolerância aos ácidos biliares, a aderência ao muco e/ou a células epiteliais e linhas celulares, a atividade antimicrobiana contra bactérias potencialmente patogénicas, a capacidade em reduzir a aderência de agentes patogénicos às superfícies e a atividade enzimática como a hidrólise de sais biliares;

- Prova cega dupla aleatória, controlada por placebo ou outro desenho de estudo apropriado, com número significativo de amostra e resultado adequado à determinação da eficácia de estirpe/produto, confirmar resultados através de testes independentes e comparar eficácia de probióticos com tratamentos típicos em condições específicas.

Quadro 1.2.2.1 - Exemplos de estirpes probióticas no mercado (WGO, 2008)

Estirpe	Marca Comercial	Produtor
<i>Bifidobacterium animalis</i> DN173 010	Activia	Danone/Dannon
<i>Bifidobacterium animalis subsp. lactis</i> Bb-12		Chr. Hansen
<i>Bifidobacterium breve</i> Yakult	Bifiene	Yakult
<i>Bifidobacterium infantis</i> 35624	Align	Procter & Gamble
<i>Bifidobacterium lactis</i> HN019 (DR10)	Howaru Bifido	Danisco
<i>Bifidobacterium longum</i> BB536		Morinaga Milk Industry
<i>Enterococcus</i> LAB SF	Bioflorin	Cerbios- Pharma
<i>Escherichia coli</i> Nissle 1917	Mutaflor	Ardeypharm
<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5		Chr. Hansen
<i>Lactobacillus acidophilus</i> NCFM		Danisco
<i>Lactobacillus casei</i> DN-114 001	Actimel, DanActive	Danone/Dannon
<i>Lactobacillus casei</i> CRL 431		Chr. Hansen
<i>Lactobacillus casei</i> F19	Cultura	Arla Foods
<i>Lactobacillus casei</i> Shirota	Yakult	Yakult
<i>Lactobacillus johnsonii</i> La1 (Lj1)	LC1	Nestlé
<i>Lactococcus lactis</i> L1A		Norrmeyerier
<i>Lactobacillus plantarum</i> 299V	GoodBelly, ProViva	NextFoods Probi
<i>Lactobacillus reuteri</i> ATCC 55730	Reuteri	BioGaia Biologics
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 53013 (LGG)	Vifit and others	Valio
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LB21	Verum	Norrmeyerier
<i>Lactobacillus salivarius</i> UCC118		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (boulardii) Iyo	DiarSafe, Ultralevure, and others	Wren Laboratories, Biocodex, e outros
Misturas de estirpes testadas		
<i>Lactobacillus acidophilus</i> CL 1285 & <i>Lactobacillus casei</i> Lbc80r	Bio K+	Bio K+ International
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GR-1 & <i>Lactobacillus reuteri</i> RC-14	FemDophilus	Chr. Hansen
(1) <i>Streptococcus thermophilus</i> , (4) <i>Lactobacillus spp.</i> , & (3) <i>Bifidobacterium spp.</i>	VSL#3	Sigma-Tau Pharmaceuticals, Inc.
<i>Lactobacillus acidophilus</i> CUL60 & <i>Bifidobacterium bifidum</i> CUL20		
<i>Lactobacillus helveticus</i> R0052 & <i>Lactobacillus rhamnosus</i> R0011	A'Biotica e outros	Institut Rosell
Estirpes <i>Bacillus clausii</i> O/C, NR, SIN e T	Enterogermina	Sanofi-Aventis

### 1.3 - Probióticos e o queijo

Os produtos lácteos são os alimentos preferenciais para a veiculação de probióticos (Giraffa et al., 2010), no entanto tem sido investigada a sua sobrevivência noutros alimentos, tais como o chocolate, bebidas, produtos vegetais e cereais (Ranadheera, Baines, & Adams, 2010).

É interessante verificar que as BAL, participantes no processo de fermentação de tantos alimentos, possuem características que as inscrevem na classificação de probióticos.

O consumo de alimentos fermentados remonta à Antiguidade. Os Romanos, para além de inserirem produtos lácteos fermentados na dieta, consideravam igualmente que, em casos de distúrbios intestinais, estes serviam de medicamento. Em 1907, Elie Metchnikoff, um estudioso russo, prémio Nobel, sugeriu que as BAL presentes nos leites fermentados poderiam promover longevidade através da remodelação da microbiota intestinal (Metchnikoff, 2004). Alimentos fermentados como kefir (Zubillaga et al., 2001) e alguns queijos, como por exemplo o Parmesão, estão associados à melhoria de problemas intestinais.

Estudar o potencial efeito de produtos lácteos e seus mecanismos de ação sobre a saúde do consumidor tem inspirado muitos investigadores (Hosono, Otani, Yasui, & Watanuki, 2002). Na literatura científica encontram-se diversos estudos que apresentam como objetivo isolar e identificar as estirpes microbianas presentes em alimentos lácteos tradicionais ou na alimentação quotidiana de forma a desvendar características benéficas que possam advir do seu consumo.

Por exemplo, Morandi e Brasca (2012) avaliaram o potencial tecnológico de 52 estirpes de *Streptococcus thermophilus* selvagens isoladas de queijos italianos; Zago et al. (2011) concluíram que 3 estirpes de *L. plantarum* recolhidos de queijos italianos e argentinos possuem potencial probiótico para futura aplicação como culturas de arranque. Succi et al. (2005) afirmam que estirpes de *L. rhamnosus* isoladas a partir do queijo Parmesão apresentam comportamento semelhante ao *Lactobacillus* GG comercial no que se refere à tolerância à acidez gástrica e aos sais biliares. Noutro trabalho foi avaliada a ação antimicrobiana de estirpes de *Pediococcus* isolados a partir de queijos artesanais sul africanos e demonstraram capacidade para inibir *Bacillus cereus* e *Listeria monocytogenes* (Gurira & Buys, 2005). *P. pentosaceus* MTCC 5151 isolado a partir de queijo produz “*in vitro*” uma nova bacteriocina que inibe *Shigella dysenteriae*, bactéria Gram negativa homofílica (Agrawal & Dharmesh, 2012). *L. casei zhang* isolado de Koumiss, uma bebida láctea fermentada de leite de égua, apresentou comportamento imunomodulador e antagonismo na presença de *E.coli* em ratos (Tuo, Su, & Zhang, 2006; Zhang, Zhang, Ren, & Bao, 2007). Por outro lado, a tolerância à acidez gástrica, aos sucos intestinais e aos sais biliares, aproximam *L. casei zhang* às características probióticas desejáveis e equiparáveis a outros



probióticos comerciais como *L. acidophilus* NCFM, *L. rhamnosus* GG e *Bifidobacterium animalis* BB12 (Guo et al., 2009).

Está também demonstrado que extratos aquosos de queijos produzidos nos Alpes franceses, “Abondance” e “Tomme de Savoie”, aumentaram de forma significativa a proliferação e a atividade metabólica dos linfócitos T humanos. É sugerido que esta ação imunomoduladora seja promovida pela presença de prebióticos, em especial, por péptidos derivados das proteínas lácteas (Durrieu, Degraeve, Chappaz, & Martial-Gros, 2006). No Gioddu, leite fermentado tradicional da Sardenha, foram isolados *Lactobacillus* capazes de aderir às células Caco-2 para além da tolerância a pH baixos e aos sais biliares (Ortu et al., 2007). Após consumir queijo Camembert durante 4 semanas, foram detetados nas fezes dos voluntários maior quantidade de *Lc. lactis* e *Leuconostoc mesenteroides* e uma redução significativa da atividade da enzima nitrato redutase (Firmesse et al., 2008).

O “Parmigiano Reggiano” tem demonstrado possuir propriedades antidiarreicas e estabilizadoras da microbiota intestinal, sendo aconselhado a sua inclusão na alimentação das crianças (Coppa, 2011). Alguns defendem que os efeitos são devidos a nutrientes bio-ativos presentes no alimento (INRAN, 2008), outros referem-se a bactérias viáveis que interagem de forma positiva com o hospedeiro.

#### **1.4 - Métodos para a deteção de efeito probiótico de microrganismos**

O isolamento de estirpes BAL com origem em alimentos fermentados e curados tem sido frequente, utilizando várias técnicas laboratoriais “*in vitro*” e “*in vivo*” para identificar um potencial probiótico ou características para futura aplicação tecnológica. As principais propriedades avaliadas numa primeira abordagem são: a resistência à acidez gástrica e aos sais biliares, a atividade antimicrobiana na presença de enteropatogénicos, a resistência antibiótica e a capacidade de adesão às células intestinais humanas (Saarela et al., 2000; Gaggia, Mattarelli & Biavati, 2010) .

##### **1.4.1 - Resistência à acidez gástrica e aos sais biliares**

De forma a avaliar a sobrevivência de uma cultura bacteriana após passagem pelo suco gástrico e fluidos intestinais, é necessário criar “*in vitro*” simuladores do trato gastro-intestinal. Os desenhos experimentais para este fim incluem a exposição a uma solução ácida de pH 2,0, representativa de suco gástrico, que contém ácido clorídrico 1,0 N e em alguns casos, pepsina e cloreto de sódio, e a uma solução ligeiramente básica de pH 8,0 com pancreatina e sais biliares.

Alguns dos métodos descritos avaliam individualmente o comportamento das bactérias em solução ácida ou solução básica, incubadas a 37°C, sendo que a viabilidade das culturas em

estudo foi avaliada aos minutos 1, 90, 180 e 240 (Charteris, Kelly, Morelli & Collins, 1998; Georgieva et al., 2008; Tinrat, Saraya & Chomnawang, 2011).

No entanto, outros pretendem a aproximação à realidade do trato gastrointestinal expondo sequencialmente as células em estudo, a uma solução ácida e a uma solução básica. Desta forma, suspendem-se as células de concentração conhecida em solução de pH 2 e incubam-se a 37 °C durante 2 a 4 horas; seguiu-se a neutralização e lavagem das células com PBS ou com solução saturada de bicarbonato de sódio, e realiza-se uma posterior suspensão em solução de pH 8 com sais biliares e pancreatina, incubada a 37 °C durante 3 a 5 horas (Succi et al., 2005; Grimoud et al., 2010) .

A viabilidade das células é avaliada pelo desenvolvimento de colónias em Man, Rogosa e Sharpe (MRS) agar incubado a 37 °C em anaerobiose durante 7 dias e é comparado com o número de células na suspensão inicial.

#### **1.4.2 - Atividade antimicrobiana**

Os métodos laboratoriais “*in vitro*” utilizados para a deteção da atividade antimicrobiana das estirpes, potencialmente probióticas, são descritas como técnicas “agar spot test” ou “spot on lawn test” ou “well’s diffusion assay”. Estes modelos são adaptações de técnicas descritas por Gratia em 1946 e Frederic em 1948 que consistem na difusão das bacteriocinas de culturas produtoras, através de meios sólidos ou semi-sólidos previamente inoculados com as estirpes indicadoras adequadas (Kékessy & Piguet, 1970).

No caso da avaliação da atividade antimicrobiana das BAL, as estirpes indicadoras desafiadas são normalmente bactérias enteropatogénicas.

Algumas técnicas consistem na centrifugação de uma suspensão da cultura de BAL, incubada durante a noite a 37°C, de forma a obter um sobrenadante livre de células. Este foi posteriormente filtrado e neutralizado, estudando-se unicamente a ação da bacteriocina produzida. No agar inoculado com a estirpe indicadora são colocadas gotas ou discos embebidos com o sobrenadante obtido (Drago, Gismondo, Lombardi, Haën & Gozzini, 1997; Çadirci & Çitak, 2005), ou são recortados poços onde se deposita o sobrenadante desprovido de células (Gopal, Prasad, Smart & Gill, 2001; Georgieva et al., 2008; Mohankumar & Murugalatha, 2011; Zago et al., 2011) . Em seguida, a caixa de Petri é incubada nas condições adequadas à cultura indicadora.

Outros desenhos experimentais, adaptados a partir da técnica descrita por Kékessy e Piguet (1970), avaliam a atividade antimicrobiana da BAL através da inoculação pontual da cultura pura num meio sólido nutritivo, incubada a 37°C durante 24-48 h. Posteriormente é sobreposta uma segunda camada de agar inoculada com a estirpe indicadora (Çadirci & Çitak, 2005; Grimoud et al., 2010; Tinrat et al., 2011). A caixa de Petri é novamente colocada em ambiente óptimo para o desenvolvimento da estirpe indicadora. Neste método,

são avaliados os vários mecanismos de ação antagônica da BAL sobre a estirpe indicadora, sem diferenciar a competição por nutrientes, a produção de bacteriocina, de peróxido de hidrogênio e de ácido láctico (Grimoud et al., 2010).

Em ambos os métodos experimentais, o antagonismo é revelado pela formação de halos de inibição, por não ocorrer o desenvolvimento da estirpe indicadora.

#### **1.4.3 – Resistência a antibióticos**

As técnicas experimentais frequentemente descritas para a avaliação das resistências antibióticas das estirpes potencialmente probióticas são designadas como Método de difusão em agar ou “Agar diffusion test”, modelos estes adaptados da técnica de Kirby e Bauer.

De forma sucinta, são colocados discos embebidos num antibiótico escolhido sobre um meio sólido adequado, MRS agar ou Mueller-Hinton (MH), inoculado com cultura bacteriana em estudo. Após um período de incubação de 24 a 48 h a 37 °C, faz-se a leitura dos resultados: o diâmetro dos halos de inibição de crescimento determina a susceptibilidade da estirpe ao antibiótico (Cenci, Rossi, Trotta & Caldini, 2002; Ortu et al., 2007; Georgieva et al., 2008; Tinrat et al., 2011).

Outros trabalhos procuraram determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) da BAL conjugando as técnicas descritas por Maietti, Bonvini, Huys e Giraffa (2007) e Klare et al. (2005). É realizada a microdiluição da cultura em caldo adequado ao Teste de susceptibilidade de BAL obtendo-se uma concentração conhecida ( $10^4$  bactéria/ml), e procede-se a uma posterior inoculação dos pocinhos de placas de microtitulação que contêm diferentes concentrações conhecidas do antibiótico. Após incubação aeróbia a 37 °C durante 24 a 48 h, a CIM é definida pela presença de desenvolvimento bacteriano na concentração imediatamente superior do antibiótico testado (turvação) (Rossetti et al., 2009; Zago et al., 2011) .

#### **1.4.4 - Adesão**

Tem sido sugerido por vários autores que a capacidade de adesão de estirpes potencialmente probióticas a recetores do muco e epitélio intestinal humano, pode influenciar o processo de colonização e persistência no intestino e consequentemente o efeito sobre o hospedeiro (Saarela et al., 2000). Para a realização de provas de aderência têm sido utilizados diversos modelos laboratoriais que fazem uso de diversos tipos de células em ensaios laboratoriais “*in vitro*”, tais como a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, linhas celulares de adenocarcinomas humanos com características representativas do epitélio intestinal, as células Caco2 e HT29, e muco intestinal.

A adesão a leveduras permite identificar os recetores manose-específicos das estirpes em estudo, característicos de bactérias patogénicas *E.coli* enterotoxinogénica e *Salmonella spp.*, que poderão competir por exclusão pelos recetores na presença destes patogénicos (Pretzer et al., 2005; Zago et al., 2011).

As linhas celulares Caco-2 e HT29, por constituírem uma boa representação fenotípica dos enterócitos, permitem observar o comportamento das bactérias na presença de células intestinais e simular a sua capacidade de adesão em condições idênticas ao trato intestinal humano (Charteris et al. 1998; Cenci et al., 2002; Ortu et al., 2007; Arboylea et al., 2011; Lee et al., 2011). Em alguns estudos foi também avaliada a capacidade destas bactérias impedirem ou reduzirem a invasão dos enterócitos por agentes patogénicos (Gopal et al., 2001; Arboylea et al., 2011; Tinrat et al., 2011).

A técnica consiste na preparação de pocinhos ou placas com uma monocamada celular e adição da estirpe em estudo numa concentração conhecida. Após algumas horas de incubação a 37°C realizam-se lavagens para retirar as células que não aderiram. A leitura pode ser realizada através da observação ao microscópio electrónico ou de luz fluorescente, ou ao microscópio óptico após coloração. É também possível realizar a contagem das bactérias em MRS agar através da destruição da camada celular, pela tripsina, seguida da lise celular com a adição de um detergente.

## **Capítulo II - Detecção de agentes microbianos de queijos da Ilha de S. Jorge e “Parmigiano Reggiano” com efeitos bióticos sobre algumas bactérias do intestino humano (trabalho experimental).**

Nas últimas décadas tem sido publicada diversa informação científica sinalizando o potencial probiótico de alguns agentes microbianos, ou suas partes, quando presentes na microbiota de queijos de pasta dura de curas muito longas. Estão particularmente documentados os casos de algumas bactérias lácticas encontradas nos queijos “Parmigiano”, Gruyère e Emmental. Em Portugal também existem alguns queijos tradicionais de pasta dura, com curas superiores a 60 dias, como os queijos da Ilha de S. Jorge, Évora, Nisa e Castelo Branco Velho, desconhecendo-se, contudo se a microbiota residente nestes queijos possui algum potencial probiótico. Para se avaliar esse potencial é necessário que a microbiota desses queijos seja alvo de pesquisas.

### **2.1 - Objetivos**

Neste trabalho procurou-se desenvolver uma metodologia simples, capaz de detetar efeitos biológicos diretos dos extratos aquosos dos queijos sobre bactérias comuns no trato digestivo humano. Em seguida procuraram-se agentes microbianos da microbiota do queijo da Ilha de São Jorge e no Parmesão capazes de expressar atividade biológica sobre os mesmos agentes bacterianos intestinais humanos. Para se poder avaliar a frequência relativa desses eventos, tomou-se como termo de comparação as BAL presentes no queijo “Parmigiano Reggiano” sumamente referidas na literatura. Procurou-se desenvolver procedimentos de isolamento de BAL e outros agentes microbianos e desafiá-los directamente com um agente patogénico característico do intestino humano, com uma bactéria comensal e com outra útil.

Entre os objetivos do trabalho desenvolvido referem-se também a conceção e a aplicação de um procedimento semiquantitativo para agrupar os efeitos observados, começando por separá-los em duas grandes categorias: antagonicos e sinérgicos.

### **2.2 - Material e Métodos**

#### **2.2.1 - Amostragem**

Procedeu-se à aquisição de 10 porções de queijos de pasta dura no comércio a retalho na região de Lisboa: 5 amostras de queijo “Parmigiano Reggiano” (cinco marcas diferentes) e 5 de queijo da Ilha de S. Jorge (cinco marcas diferentes). Os pedaços (fatias radiais) de queijos encontravam-se embalados e rotulados, tendo sido possível distinguir diferentes tempos de cura. Foi possível registar que algumas das amostras de queijo “Parmigiano

Reggiano” tinham mais de 12 meses de cura e as amostras de queijo da Ilha de S. Jorge, tinham entre 4 e 7 meses de cura no momento do embalamento.

Também a rotulagem apontava para diferentes prazos de validade para consumo, entre 6 e 8 meses, antes de se vencer a respetiva data.

As amostras foram mantidas em embalagem plástica selada a vácuo nas condições indicadas pelos fabricantes.

## **2.2.2 - Extratos aquosos dos queijos e avaliação da respetiva atividade biológica**

Procedeu-se à extração de constituintes hidrossolúveis das amostras de queijo, colhendo asepticamente 2 g da massa de cada queijo (parte interna) e realizando uma suspensão em 8 ml de água destilada esterilizada (pH≈ 6,8 a 7). A mistura foi homogeneizada durante 2 minutos em Stomacher 400 em saco de plástico estéril. A suspensão aquosa foi distribuída em tubos Eppendorf de 1,5 ml, em duplicado, seguida de centrifugação a 3000 rpm durante 10 minutos. Recolheu-se o sobrenadante e distribuiu-se em tubos Eppendorf esterilizados.

O procedimento de extração foi realizado duas vezes, tendo o segundo extrato aquoso sido esterilizado através da filtração por filtros Milipore com 0,22 µm de porosidade (Millex, Interface, Lda).

Os sobrenadantes filtrados foram depositados em duplicado, em poços perfurados, sobre geloses inoculadas com as bactérias desafio de origem intestinal humana (150 µl /poço).

As estirpes bacterianas desafiadas foram:

*Shigella dysenteriae* NCTC 4837 (serotipo 1)

*Enterococcus faecium* NCTC 7171

*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB12 (coleção privada)

As culturas destas bactérias desafiadas foram preparadas da seguinte forma: adicionou-se 1 ml de uma suspensão de *S. dysenteriae* ou de *E. faecium* (suspensões com opacidade equivalente a 2 Mcfarland (BioMérieux, 70900) diluída a 1/10) a 10 ml de gelose de MH (Oxoid, CM0337) fundida e mantida a 48 °C, realizando uma sementeira por incorporação. Após solidificação da gelose inoculada, adicionou-se uma segunda camada de 25 ml de “Bacto-agar” a 1,5% (Difco, 214050) e deixou-se solidificar.

Nas caixas de Petri contendo as duas camadas de gelose referidas anteriormente, assinalaram-se seis quadrantes, no centro dos quais se perfurou um corte cilíndrico de modo a criar um poço, no qual se depositaram 150 µl de extrato aquoso de cada queijo, cinco amostras por caixa de Petri. Foram testados dois tipos de extratos em separado: um centrifugado e outro submetido a filtração esterilizante. O sexto poço foi preenchido com 150

µl de uma solução de inulina (Merck - 4733) a 1%, usada como testemunha. Os ensaios foram realizados em duplicado.

As caixas de Petri com as culturas bacterianas desafiadas pelos extratos dos queijos, foram incubadas a 37 °C durante 24 h em atmosfera seca (exsicação com sílica).

Decorrido o período de incubação, procedeu-se à leitura das eventuais reações de inibição (halos sem cultura com mais de 1 mm em torno das paredes dos poços).

Para desafiar *Bifidobacterium*, adicionou-se 1 ml de uma suspensão de *Bifidobacterium* (suspensão com opacidade equivalente a 2 Mcfarland) a 10 ml de gelose de MRS (Oxoid, CM0361), modificada com 0,5% de Hidroclorato de L-Cisteína (Merck-2430), fundida e mantida a 48 °C, realizando uma sementeira por incorporação. Após solidificação do meio, foram colocados à superfície discos de papel absorvente esterilizados com 1 cm de diâmetro, em cima dos quais se depositaram 75 µl de cada um dos extratos aquosos centrifugados dos queijos. No sexto disco depositaram-se 75 µl de uma solução de inulina a 1 % (Merck - 4733). Após absorção dos líquidos adicionou-se uma segunda camada de 25 ml de “Bacto-agar” a 1,5 % (Difco, 214050) e deixou-se solidificar. As caixas de Petri assim inoculadas foram incubadas a 37 °C durante 3 dias, em anaerobiose. Findo o período de incubação procedeu-se à leitura dos halos de inibição.

No caso dos extratos filtrados (5 x 2) foi adotada outra técnica: procedeu-se ao recorte dos poços cilíndricos e incubaram-se as culturas desafio em jarras de anaerobiose.

### **2.2.3 - Isolamento de bactérias existentes em Queijos da Ilha de S. Jorge e “Parmigiano Reggiano”**

A partir da mesma mistura aquosa referida em 2.2.2, não centrifugada nem filtrada, retirou-se 0,1 µl de cada uma das suspensões com uma ansa esterilizada e calibrada e realizou-se uma sementeira por estria na superfície de MRS (Oxoid, CM0361) e MH (Oxoid CM0337) para deteção de colónias de bactérias indiferenciadas. As caixas de MH agar foram incubadas em aerobiose e as de MRS agar, semeadas em duplicado, foram incubadas em aerobiose (metade) e a outra metade em anaerobiose. As culturas foram mantidas a 37°C durante 48h.

### **2.2.4 - Pesquisa de atividade inibidora nas bactérias isoladas dos Queijos da Ilha de S. Jorge e “Parmigiano Reggiano”**

Após o período de incubação das culturas, as colónias obtidas foram observadas, marcadas e assinalaram-se os diferentes morfotipos presentes. Foram selecionadas colónias isoladas para se proceder ao respetivo desafio com culturas das bactérias do intestino humano referidas em 2.2.2. (*S. dysenteriae*, *E. faecium* e *Bifidobacterium* sp.).

As colónias isoladas foram sinalizadas e submetidas a ensaios de biocompetição utilizando o seguinte procedimento:

a) Efetuaram-se sementeiras por incorporação em 10 ml de gelose de MH (Oxoid, CM0337) mantida fundida a 48 °C, com 1 ml de suspensões de *S. dysenteriae* ou de *E. faecium* de opacidade equivalente a 2 McFarland (BioMérieux, 70900) diluída a 1/10. Após solidificação das geloses inoculadas, adicionou-se uma segunda camada de 25 ml de MH ou MRS agar e deixou-se solidificar.

b) Efetuou-se uma sementeira por incorporação em 10 ml de gelose com 1ml de uma suspensão concentrada de *Bifidobacterium sp.* a uma opacidade equivalente a 2 McFarland. Após solidificação depositou-se uma segunda camada não inoculada de gelose de MH ou MRS, de modo a permitir o desenvolvimento das estirpes bacterianas isoladas primariamente nestes mesmos meios de cultura.

c) Foram delimitados diversos quadrantes no reverso das caixas de Petri assim preparadas, identificando-se cada setor destinado ao teste de desafio de cada estirpe isolada dos queijos. Procedeu-se uma sementeira por picada central, perfurando as duas camadas de gelose, com cada um dos 225 isolados obtidos dos queijos (163 (72,4%) obtidos das amostras de Queijo da Ilha e 62 (27,6%) de “Parmigiano Reggiano”).

d) As culturas de confrontação assim organizadas foram incubadas a 37 °C durante 48 h no caso das caixas de Petri inoculadas com *S. dysenteriae* ou de *E. faecium* e 72 horas para as culturas de *Bifidobacterium sp.*

e) Concluídos os períodos de incubação, procedeu-se à leitura das reações observadas na zona de interação das culturas, entre os isolados dos queijos e as três estirpes de origem intestinal humana desafiadas. Os efeitos das interações foram registados e classificados em sinérgicos, antagónicos ou indiferentes.

Todos os isolados selecionados foram numerados e repicados para meios de conservação, mantidos a - 30 °C, com o fim de serem utilizados nos ensaios subsequentes.

### **2.2.5 - Identidade das estirpes selecionadas**

Procedeu-se à selecção e à purificação dos isolados bacterianos que revelaram sinergismo com *Bifidobacterium sp.*, inibição de *S. dysenteriae* ou que não tenham produzido efeito na presença deste patógeno. Foram descartadas as estirpes que apresentaram inibição de *B. animalis subsp lactis* e sinergismo com *S. dysenteriae*.

Após o reisolamento das culturas bacterianas recolhidas dos queijos, com evidentes efeitos biológicos sobre as estirpes desafiadas, procedeu-se à respetiva identificação.

O procedimento foi iniciado com uma caracterização morfológica através de um esfregaço e coloração de Gram.



Os agentes microbianos com uma micromorfologia compatível com o género *Lactobacillus* e *Pediococcus* foram submetidos a teste para a deteção da produção de catalase.

Seguiram-se provas de caracterização fenotípica, testando a capacidade de multiplicação dos isolados em diferentes concentrações de sal (4% e 6,5% de NaCl) e a diferentes temperaturas (15 °C, 37 °C e 45 °C).

Cada um dos isolados foi depois testado quanto à sua capacidade de fermentação ou acidificação da glucose. Para isso utilizou-se um caldo de cultura basal para fermentação (Púrpura Agar Base - BD Difco 222810), depositado em tubo de polipropileno (3 ml), rolhado, no qual se colocou um tubo de Durham invertido. O açúcar (glucose) foi adicionado extemporaneamente após filtração esterilizante. Os mesmos isolados foram também avaliados quanto à sua capacidade de utilização da glucose, utilizando caldo de MRS (Oxoid: CM0359) no mesmo tipo de tubos com tubo de Durham invertido. Todas as culturas foram incubadas a 37 °C durante 48 h. Decorrido o período de incubação procedeu-se à respetiva leitura, interpretação e registo dos resultados.

A conjugação dos aspetos morfológicos com as reações registadas nesta bateria de testes preliminares permitiu constituir 9 grupos maiores de agentes bacterianos. De cada um destes grupos foi selecionado pelo menos um representante para identificação bioquímica através do sistema API 50 CHL (BioMérieux - 50410). Os 10 isolados testados tinham sido obtidos tanto a partir do queijo “Parmigiano Reggiano” (3) como do queijo ilha de S. Jorge (7).

## 2.3 - Resultados e Discussão

As bactérias selecionadas para avaliar o efeito biótico dos extratos em estudo foram *Shigella dysenteriae*, um microrganismo patogénico estrito humano, *Enterococcus faecium*, uma estirpe comensal presente no intestino humano, e *Bifidobacterium animalis subsp lactis*, um agente probiótico frequentemente incorporado em alimentos comerciais.

De acordo com a WHO, o género *Shigella* é uma das principais causas de quadros de disenteria por todo o mundo. As crianças com idade inferior a 5 anos são o grupo etário mais afetado (Fernandez & Sansonetti, 2003) apresentando sintomas como febre, diarreia, ulceração das mucosas, dores abdominais e tenesmo. É uma doença característica de países em desenvolvimento, associada a má higiene e ausência de água potável; nestes países a espécie mais frequente é *S. flexneri*. No entanto já foram detetados surtos de *S. dysenteriae* e *S. sonnei* em países desenvolvidos (Public Health Agency of Canada).

As bactérias pertencentes ao género *Enterococcus* podem ser naturalmente encontradas no solo, superfície da água, esgoto, plantas e no sistema gastrointestinal humano e animal. *E. faecium* é um dos enterococos dominantes da microbiota comensal do intestino do Homem. Por outro lado, a presença deste microrganismo no trato gastrointestinal de animais pode originar a contaminação fecal do leite durante a ordenha e da carne no momento do abate. Desta forma, *E. faecium* participa na cura de alguns queijos como cultura de arranque e em produtos fermentados de origem cárnea. *E. faecium* é utilizado como probiótico, sob a forma de suplemento alimentar em animais, para tratar ou prevenir diarreias. No entanto, a utilização como probiótico em suplementos ou a sua incorporação em alimentos para posterior consumo humano tem levantado algumas questões de segurança alimentar devido às resistências antibióticas, especialmente à vancomicina, que podem ser transferidas entre bactérias através de genes móveis (Franz, Huch, Abriouel, Holzapfel, & Galvez, 2011).

Sabendo que as bifidobacterias constituem um dos principais géneros da flora comensal humana e que a sua presença em quantidades elevadas no intestino está associada a um bom estado de saúde do hospedeiro, configura-se interessante a utilização de um *Bifidobacterium sp.* reconhecido como probiótico. *Bifidobacterium animalis subsp lactis* (BB12), isolado em fezes de origem animal e humana, demonstra capacidade de colonização e multiplicação no interior do intestino, como também possui atividades promotoras da saúde através da imunomodulação, prevenção de diarreias e atividade antimicrobiana na presença de agentes patogénicos (Saarela et al., 2000; Gopal et al., 2001; Russel et al., 2011).

### 2.3.1 - Efeitos bióticos dos extratos aquosos dos Queijos da Ilha de S. Jorge e “Parmigiano Reggiano”

A inulina foi selecionada para testemunha positiva na avaliação da atividade biológica dos extratos de queijo devido ao seu efeito bifidogénico no colón humano (Araújo, Carvalho, Leandro, Furtado, & Moraes, 2010; Makras, Van Acker, & De Vuyst, 2005). Este composto é um oligossacárido tipo fructano não digerível de cadeia linear, com ligações glicosídicas  $\beta(2-1)$  e um grau de polimerização acima de 60.

Este carboidrato é considerado um prebiótico, ou seja, um ingrediente que após a sua ingestão, não sofre a digestão das enzimas intestinais e atinge o colón de forma intacta. Esta substância deve estimular o crescimento selectivo de microrganismos benéficos no colón em detrimento dos patogénicos (WGO, 2008). É um dos prebióticos mais estudados do mercado e costuma ser adicionado a alimentos para promover o aumento do teor de fibra, sem provocar alterações no sabor e textura do produto final (Kalyani Nair, Kharb, & Thompson, 2010).

No entanto, durante a avaliação da atividade dos extratos de queijo, a inulina a 1 % não promoveu o desenvolvimento de sinergismo em nenhuma das estirpes conhecidas, e consequentemente os resultados relativos a este oligossacárido não foram interessantes. De facto, Van der Meulen, Avonts, and De Vuyst (2004) ao identificarem a capacidade de *B. animalis* metabolizar diversos substratos, concluíram que esta estirpe dá preferência a pequenas cadeias de oligossacáridos e não utiliza a inulina como fonte de carbono.

Nos ensaios relativos à atividade dos extratos aquosos, observou-se que o extrato centrifugado não filtrado das amostras do queijo “Parmigiano Reggiano” apresentou uma baixa frequência de efeito inibidor (10% das amostras) e de sinergismo (10%) com *S. dysenteriae*.

Os mesmos extratos revelaram ter capacidade para promover sinergismo em 50% dos ensaios efetuados com *E. faecium*. Não se registou qualquer efeito inibidor nos ensaios em que *E. faecium* foi desafiado pelos extratos das amostras de queijo “Parmigiano Reggiano”. Os extratos do Queijo da Ilha de São Jorge demonstraram atividade inibidora em 67% dos ensaios com *S. dysenteriae*. Estes extratos revelaram-se sinérgicos em 46% dos ensaios efetuados com *E. faecium* e uma menor frequência de ações inibidoras (6,7%) (Quadro 2.3.1.1).

Quadro 2.3.1.1.- Positividade (%) para atividades inibidoras e sinérgicas de *Shigella dysenteriae*, *Enterococcus faecium* e *Bifidobacterium animalis ssp lactis* (BB12) reveladas pelos extratos de queijo centrifugados (seis ensaios por amostra)

Extratos de queijos	<i>S. dysenteriae</i>		<i>E. faecium</i>		<i>Bifidobacterium sp.</i>	
	Inibição	Sinergismo	Inibição	Sinergismo	Inibição	Sinergismo
“Parmigiano Reggiano”	3 (10%)	3 (10%)	0	15 (50%)	2 (6,7%)	7 (23,3%)
Ilha de S. Jorge	20 (67%)	0	2 (6,7%)	14 (46%)	0	4 (13%)

A avaliação dos efeitos dos extratos aquosos de ambos os queijos sobre *Bifidobacterium sp.* foi efetuada utilizando discos esterilizados embebidos, com o objetivo de não prejudicar as condições de anaerobiose das respectivas culturas. Esta técnica não apresentou grande vantagem, pois apesar de manter a anaerobiose, a quantidade de líquido utilizado era inferior ao que se colocou em cada pocinho. A leitura foi também dificultada pela presença de um disco de papel opaco, em especial, nas situações de sinergismo. Outra dificuldade, foi a que decorreu da ocorrência da difusão dos extratos entre as camadas de agar e o agar semeado, reduzindo assim o impacto sobre *Bifidobacterium sp.*

A atividade dos extratos das cinco amostras de queijos “Parmigiano Reggiano” não foi consistente no caso do desafio com *Bifidobacterium sp.*, porque registaram-se efeitos inibidores em 6,7% dos casos e sinérgicos em 23,3% dos ensaios. Já no caso das amostras do queijo da Ilha de S. Jorge apenas se verificaram efeitos sinérgicos em 13% dos ensaios e não se constatarem efeitos de inibição (Quadro 2.3.1.1).

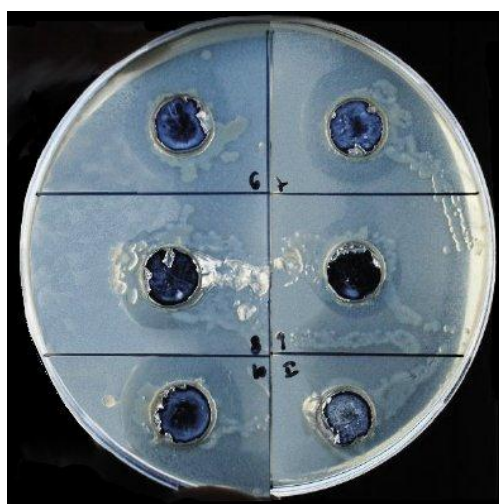
Os extratos de queijo filtrados não apresentaram um comportamento biológico coincidente com os que foram observados com os extratos centrifugados não filtrados (Quadro 2.3.1.2). Basicamente os resultados não evidenciaram uma diversidade de efeitos tão heterógeneos como na prova anterior. As amostras de queijo “Parmigiano Reggiano”, purificadas por filtração esterilizante, não revelaram qualquer efeito sobre *S. dysenteriae*. No entanto, possuíam atividade sinérgica para *E. faecium* (80%) e *Bifidobacterium sp.* (40%). Todas as amostras de queijo da Ilha de S. Jorge demonstraram ter efeito antagónico para *S. dysenteriae* (100%) e bastante sinergismo para *E. faecium* (80%) e *Bifidobacterium sp.* (60%) (Quadro 2.3.1.2).

Nos procedimentos de avaliação da atividade dos extratos filtrados das amostras de queijo para *Bifidobacterium sp* em poços, verificou-se que a técnica tinha uma praticabilidade superior, na medida em que permitia uma maior facilidade de interpretação dos resultados. Este facto deve ter sido auxiliado pela aerotolerância da estirpe de *Bifidobacterium sp.* utilizada no trabalho (Masco, Ventura, Zink, Huys, & Swings, 2004).

Quadro 2.3.1.2.- Frequência de interações bióticas dos extratos de queijo filtrados com *S. dysenteriae*, *E. faecium* e *Bifidobacterium animalis ssp lactis* (dois ensaios por amostra)

Queijos	<i>S. dysenteriae</i>		<i>E. faecium</i>		<i>Bifidobacterium</i>	
	Inibição	Sinergismo	Inibição	Sinergismo	Inibição	Sinergismo
“Parmigiano Reggiano”	0	0	0	8 (80%)	0	4 (40%)
Ilha de São Jorge	10(100%)	0	0	8 (80%)	0	6 (60%)

Figura 2.3.1.1 – Halos de inibição observados para *S. dysenteriae* com extrato de queijo da Ilha de São Jorge filtrado (foto original)



O propósito desta fase experimental foi conhecer um efeito que não esteja directamente relacionado com uma bactéria em particular, mas sim, com uma propriedade biótica veiculada pelo queijo.

A utilização de um extrato centrifugado e de outro esterilizado por filtração permitiu identificar uma ligeira diferença nos resultados. A esterilização do extrato aquoso, utilizando um filtro de 0,22 µm de porosidade, permitiu a obtenção de um líquido sem células bacterianas, contendo apenas e provavelmente compostos de baixo volume molecular, péptidos ou oligossacáridos, e/ou substâncias inibidoras como bacteriocinas, peróxido de hidrogénio e ácidos orgânicos. Enquanto a centrifugação do extrato promoveu a concentração de partículas mais pesadas no fundo, poderão ter passado células bacterianas que influenciaram os resultados ou compostos de baixo peso molecular que não foram sujeitos à retenção no processo de filtração.

Num estudo realizado por Gatti et al. (2008), utilizando um modelo laboratorial idêntico para obtenção de extrato aquoso a partir de “Parmigiano”, identificaram-se por LH-PCR várias porções de células lisadas (*L. delbrueckii subsp. lactis* ou *subsp. bulgaricus*, *L. delbrueckii subsp. lactis*, *L. helveticus*, *L. rhamnosus* e *L. casei* ou *L. plantarum*) ao longo da cura do queijo, com picos persistentes até aos 24 meses. Por outro lado, Coppa (2007) descreveu o “Parmigiano Reggiano” como um queijo livre de lactose, por possuir este açúcar numa quantidade inferior à definida pelo regulamento da comissão Europeia no que se refere a

leites artificiais de recém-nascidos, embora na leitura da “High Performance Anion Exchange Chromatography” tenham sido observados picos relativos a outros oligossacáridos que não coincidiam com o pico da lactose. Em ambos os trabalhos mencionados os extratos aquosos estudados foram filtrados por membranas de 0,22 µm.

De facto, são vários os médicos pediatras, em Itália, que aconselham a inclusão de “Parmigiano” na dieta de crianças lactentes e, em especial, em pacientes afetados por inflamações ou distúrbios intestinais defendendo que este é um alimento de elevada digestibilidade (Pancaldi, Mariotti, & Balli, 2008) .

As paredes bacterianas fragmentadas e os oligossacáridos na matriz do Parmesão podem ter sido usados como substratos por *Bifidobacterium sp.* e *Enterococcus sp.* desafiados visto estes terem apresentado um desenvolvimento superior ao de *Shigella sp.*

Por outro lado, num trabalho que procurou identificar péptidos resultantes da hidrólise da caseína do leite, com atividade antimicrobiana no extrato aquoso de 9 queijos italianos, foi concluído que 5 queijos apresentaram péptidos com as propriedades desejadas mas que o “Parmigiano” não possuía esses péptidos (Losito et al., 2006; Rizzello et al., 2005). Este facto pode em parte justificar a ausência de efeito antagónico sobre *S. dysenteriae*.

É interessante verificar que os extratos do queijo da Ilha de São Jorge promoveram uma inibição clara na estirpe patogénica (Figura 2.3.1.1). Kongo et al. (2009) avaliaram a proteólise que decorre no período de cura deste queijo e detetaram que ao fim de 130 dias a alfa e beta caseínas eram quase totalmente hidrolisadas em péptidos, péptidos mais curtos e alguns aminoácidos livres. Talvez algum destes péptidos possua atividade antimicrobiana, ou talvez sejam outros mecanismos de acção como a produção de ácidos orgânicos, bacteriocinas ou peróxido de hidrogénio.

O efeito de sinergismo foi igualmente evidente para *Enterococcus sp* e *Bifidobacterium sp*, com o extrato de queijo da Ilha de São Jorge, que poderá ser explicado pela utilização dos detritos de células lisadas que se acumulam e/ou de outros subprodutos da atividade microbiana durante o período de cura.

### **2.3.2 - Atividade inibidora das bactérias isoladas**

O efeito inibidor das estirpes presentes no queijo é útil para a sua biopreservação. Para além da produção de ácidos orgânicos, podem também produzir compostos antimicrobianos, que incluem o peróxido de hidrogénio, compostos alcoólicos, diacetil e bacteriocinas. As espécies de *Lactobacillus* são frequentemente responsáveis por esta ação antagonista (Cruz et al., 2009).

Selecionou-se um número superior de isolados a partir do Queijo da Ilha de S. Jorge (163 num total de 225). Esta maior facilidade de isolamento de agentes bacterianos a partir do queijo açoreano pode estar associada ao período de cura a que cada queijo foi sujeito. Um

período de maturação mais prolongado de um queijo, pode conduzir a uma redução da microbiota viável por falta de nutrientes disponíveis. Por outro lado, a existência de bactérias não cultiváveis pode ter conduzido a uma subestimação de UFC/g no queijo (Gatti et al., 2008; Neviani et al., 2009). Nos ensaios realizados só duas das amostras de queijo “Parmigiano Reggiano” revelaram desenvolvimento de culturas bacterianas (amostras 3 e 4) nas condições de crescimento impostas.

A realização das sementeiras com ansa calibrada possibilitou uma estimativa da carga microbiana no queijo, a partir da contagem de UFC por placa. Em cada amostra de Queijo da Ilha (6,7,8,9 e 10) encontraram-se aproximadamente  $10^{7.5}$  UFC/g. Este valor está de acordo com o encontrado por Kongo et al. (2009).

A selecção das colónias foi aleatória, tendo-se procurado escolher a maior variabilidade possível em cor, forma, tamanho e textura. As UFCs apresentavam diâmetros variáveis, desde 0,1-0,5 mm, cores desde o branco leitoso a transparente, podendo ser opacas ou iridescentes. De textura líquida a espessa, apresentavam-se sob a variante S ou R. A maioria das UFCs era circular e algumas colónias apresentavam irregularidades no seu contorno. No Quadro 2.3.2.1 encontram-se descritas as condições de crescimento, o número de UFCs detetadas e a sua origem.

Quadro 2.3.2.1 - Condições de crescimento e número de isolados bacterianos dos Queijos da Ilha de São Jorge e “Parmigiano Reggiano”

Meio Queijo	MH Aerobiose	MRS aerobiose	MRS anaerobiose	Total por queijo	Total
“Parmigiano Reggiano”	17	21	24	62	225
Queijo da Ilha de São Jorge	43	69	51	163	

Após 48 h de incubação foi possível fazer uma leitura clara da atividade biológica das bactérias isoladas a partir dos queijos em estudo. Na figura 2.3.2.1 são visíveis halos de inibição de *S. dysenteriae*. Na figura 2.3.2.2 está exemplificado o efeito sinérgico entre uma bactéria isolada e *Bifidobacterium sp.*

Figura 2.3.2.1 – Halos de inibição observados com estirpes bacterianas isoladas do queijo da Ilha de S. Jorge desafiadas por *S. dysenteriae* (foto original)



Figura 2.3.2.2 – Sinergismo entre um isolado e *Bifidobacterium sp* (foto original)

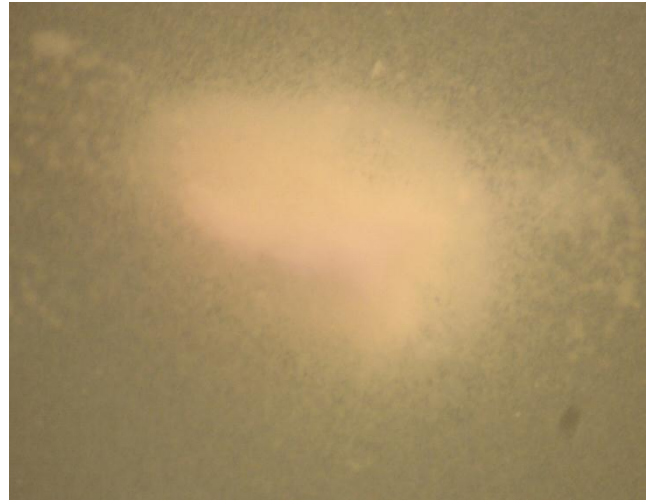


Figura 2.3.2.3 - Efeito inibidor e sinérgico secundário de um isolado de queijo da Ilha de S. Jorge e *Bifidobacterium sp* (foto original)





Figura 2.3.2.4 – Efeito inibidor de um isolado de Queijo da Ilha de S. Jorge sobre *Bifidobacterium sp* (foto original)



No decurso da leitura dos resultados da interação das culturas bacterianas foi registado, com relativa frequência, um fenómeno particular de difícil interpretação. A observação das culturas com lupa esterioscópica permitiu detetar um halo de inibição no contorno próximo do isolado semeado por picada, imediatamente envolvido por um segundo halo de densificação da cultura bacteriana desafiada (efeito sinérgico secundário no limite externo do halo de inibição) (Figura 2.3.2.3). Este fenómeno decorre, provavelmente, do facto de existir maior disponibilidade de nutrientes na gelose na periferia do halo de inibição que permitirá às primeiras colónias sobreviventes desenvolverem-se com maior exuberância. Outra explicação possível poderá decorrer da heterogeneidade dos metabolitos produzidos pelos isolados obtidos dos queijos: eventualmente alguns compostos polares, de mais baixo peso molecular, poder-se-ão ter difundido a maior distância na gelose e serem, eles próprios, sinérgicos da bactéria desafiada (ácidos orgânicos de cadeia curta, vitaminas, péptidos).

A favor desta segunda hipótese concorre o facto de, na maioria dos resultados de antagonismo, o halo de sinergismo secundário não se ter registado (Fig. 2.3.2.4).

Como já foi referido em 2.2.4, a seleção dos isolados bacterianos obtidos dos queijos foi restringida aos agentes com potencial efeito probiótico, assumindo os seguintes pressupostos:

- Isolado com efeito sinérgico para *B. animalis subsp. lactis*,
- Ausência de sinergismo para *S. dysenteriae*, e
- Os resultados de *E. faecium* não foram tidos em conta na selecção dos isolados pois apresentaram-se muito variados, no entanto foram continuamente registados para posterior discussão.

Selecionaram-se 67 isolados bacterianos que cumpriam estes requisitos, elencados no Quadro 2.3.3.1, assinalando-se aí a atividade biológica para *S. dysenteriae*, *E. faecium* e *Bifidobacterium sp.* Do conjunto selecionado, 41 (61%) isolados foram obtidos a partir das amostras de queijo da Ilha de S. Jorge e 26 (39%) das de “Parmigiano Reggiano”.

É interessante notar que, apesar de o número de bactérias inicialmente obtidas a partir de Parmesão, ter sido reduzido, a sua interação sinérgica com *Bifidobacterium sp* foi significativamente superior à identificada no Queijo da Ilha. Das 62 estirpes inicialmente isoladas no Parmesão, 42% (26) apresentaram efeito sinérgico para *Bifidobacterium sp*, enquanto que no Queijo da Ilha, das 163 estirpes testadas, apenas 25% (41) apresentaram o mesmo efeito.

### **2.3.3 - Identidade das estirpes selecionadas**

Todas as bactérias selecionadas apresentaram coloração Gram-positiva e eram não esporuladas. A variabilidade das formas foi evidente, entre bacilos longos e estreitos a bacilos curtos ou dobrados dispostos em cadeia e, em alguns casos, observaram-se formas arredondadas quase coccoídes que se organizavam em cachos. A aparência destas estirpes corresponde às descrições do Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (2009) para *Lactobacillus* e *Pediococcus*.

Todas os isolados revelaram teste de catalase negativo na presença de água oxigenada (10 vol) e multiplicaram-se em caldo de MRS incubado a 37 °C. Dois isolados produziram gás quando incubados nestas condições (Figura 2.3.3.1).

Também todos os isolados cultivados em caldo de fermentação de açúcares usando como única fonte de carbono disponível, a glucose, incubados a 37 °C, revelaram capacidade para acidificar o meio de cultura (Figura 2.3.3.2). Todas as BAL produzem ácido láctico como resultado de metabolização do substrato.

Os testes de desenvolvimentos das culturas bacterianas a duas temperaturas diferentes (15°C e 45°C) e a diferentes concentrações de cloreto de sódio (4% e 6,5%), permitiram agrupar os isolados em 9 grupos distintos (Quadro 2.3.3.2.).

Quadro 2.3.3.1 – Atividade inibidora de estirpes selecionadas na presença de *Shigella dysenteriae*, *Enterococcus faecium* e *Bifidobacterium animalis*

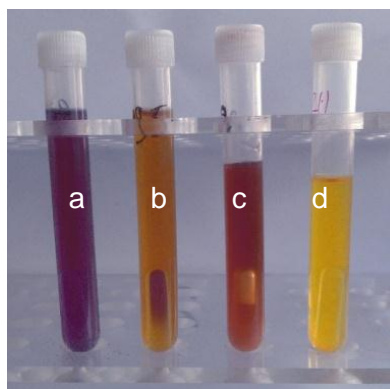
Código	<i>S.dysenteriae</i>	<i>E.feacium</i>	<i>Bifidobacterium</i>	Código	<i>S.dysenteriae</i>	<i>E.feacium</i>	<i>Bifidobacterium</i>
6	0	0	2	121	0	0	2
7	0	0	2	126	0	0	2
11	0	0	2	138	0	0	2
12	0	0	2	148	0	0	2
13	0	0	2	150	1	0	2
16	0	0	2	155	1	0	2
17	0	0	2	159	1	0	2
18	0	1	1+2	186	1	1	1+2
21	0	0	2	190	1	1+2	1+2
22	0	0	2	191	1	2	1+2
23	0	1	1+2	195	1	1+2	1+2
24	0	0	2	196	1	0,5	1+2
25	0	0	2	197	0,5	2	1+2
27	0	0	2	199	0,5	2	1,5
29	0,5	1	1+2	201	0,5	2	1,5
30	0	0,5	2	202	0	0	2
32	0	0	2	205	0,5	1	2
33	0	0	2	206	0,5	1	2
34	0	1	1+2	207	0,5	0	2
38	1	0,5	2	209	0	1+2	1+2
56	0	2	1+2	210	0	1+2	2
58	1	0	1+2	211	0	0,5	1+2
66	0,5	0	1+2	212	0	2	1+2
69	1	2	1+2	213	0	0,5	1+2
70	0	2	1+2	214	0	0	1+2
75	0,5	0,5	1+2	215	1	2	1+2
78	1	1	1+2	216	1	0	2
85	1	1	1+2	217	0	0	1+2
86	1	1	1+2	218	0	2	2
92	0,5	0	1+2	219	0	2	1+2
93	1	0	1+2	220	1	2	2
106	1	1	1+2	224	1	2	2
108	1	1	1+2	225	1	0	1+2
109	1	1	1+2				

Legenda : 1-inibição franca; 0,5-inibição ligeira; 2-sinergismo; 1+2-inibição com sinergismo; 0-sem efeito

Figura 2.3.3.1 – Produção de gás em caldo MRS incubado a 37°C (foto original)



Figura 2.3.3.2 - Produção de ácido e de gás em caldo de fermentação de glucose (foto original)



Legenda: a) sem acidificação; b) acidificação com tubo de Durham sem produção de gás; c) caldo MRS com produção de gás no tubo de Durham; d) acidificação clara

Quadro 2.3.3.2.-Desenvolvimento dos isolados selecionados em caldo de MRS a 45°C, 15°C, 4 % NaCl e 6,5% NaCl

Provas bioquímicas	Queijo de origem		
	Queijo da Ilha	“Parmigiano Reggiano”	
45°C, 15°C, 4% NaCl e 6,5 % NaCl	13	10	
45°C, 15°C e 4% NaCl	1	3	
45°C, 4% NaCl e 6,5% NaCl	---	10	
45°C e 4% NaCl	2	2	
15°C	1	----	
15°C, 4% NaCl e 6,5% NaCl	13	----	
15°C e 4% NaCl	3	----	
4% NaCl	3	----	
Não cresceram	5	1	
Totais	41	26	67

O tratamento térmico ao qual um queijo é submetido durante o seu processo de fabrico influencia a microbiota “non starter” que irá permanecer durante o período de cura.

O “Parmigiano Reggiano” é um queijo que atinge a temperatura de 55°C durante o “trabalho” da coalhada e isso efetivamente influenciou os isolados testados, pois todos se desenvolveram, pelo menos, à temperatura de 45°C com a exceção de um isolado que não sobreviveu em nenhuma das condições impostas. As bactérias isoladas a partir destas amostras apresentaram o comportamento termodúrico ou termotolerante esperado.

O Queijo da Ilha por seu lado, por não atingir temperaturas tão altas durante o “trabalho” da coalhada, definiu uma microbiota mesófila e, na sua maioria, manifestou desenvolvimento a 15°C. Alguns isolados suportaram temperaturas de 45°C e houve dois que só se multiplicaram em condições de temperatura alta. Desta forma, os isolados do Queijo da Ilha caracterizados bioquimicamente são mesófilos e termodúricos.

Em ambos os queijos, a maioria dos isolados resiste a concentrações de sal elevadas: dos 67 isolados, 60 desenvolveram-se a 4% de sal e 46 a 6,5% de sal.

Aleatoriamente, foram selecionados 10 isolados, um de cada grupo, para identificação através do sistema API 50 CHL. No Quadro 2.3.3.3 encontram-se descritos os resultados para cada um dos isolados testados.

Quadro 2.3.3.3.- Resultados de API 50 CHL dos isolados selecionados a partir de isolamentos obtidos dos queijos Parmesão e da Ilha de S. Jorge

Nº de estirpe	Identificação	ID
11	<i>Lb. paracasei ssp paracasei</i> 3	79,5%
23	<i>Lb. paracasei ssp paracasei</i> 1	97,7%
33	<i>Lb. paracasei ssp paracasei</i> 1	99,9%
38	<i>Lb. paracasei ssp paracasei</i> 1	99,9%
75	<i>Lb. paracasei ssp paracasei</i> 1	99,0%
86	<i>Lb. paracasei ssp paracasei</i> 1	96,8%
92	<i>Lb. paracasei ssp paracasei</i> 1	99,7%
202	<i>Lb. buchneri</i>	99,4%
209	<i>Lb. rhamnosus</i>	97%
210	<i>Lb. curvatus ssp curvatus</i>	99,2%

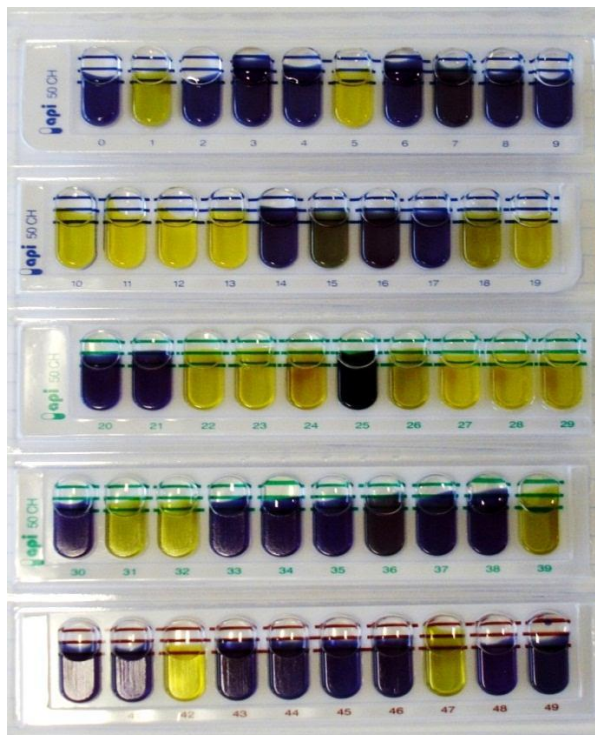
### 2.3.3.1 - Isolados identificados no Queijo da Ilha de S.Jorge

Segundo a literatura científica, a microbiota predominante no Queijo da Ilha de São Jorge é *Lactobacillus paracasei*, tendo sido também identificado *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *L. coryniformis*, *Enterococcus faecium* e *E. faecalis*. (Kongo et al., 2007). De facto, os 7 isolados identificados com sistema de API 50 CHL coincidiram com a estirpe predominante inicialmente mencionada: *L. paracasei subsp paracasei*.

A caracterização bioquímica dos isolados possuía alguma variabilidade, pois apesar de terem sido identificadas duas variantes de uma única espécie, a multiplicação a diferentes temperaturas e em concentrações de sal variáveis, não foi homogénea.

Segundo o Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (2009), *L. paracasei subsp paracasei* desenvolve-se no intervalo de temperaturas de 10 e 40°C mas, por outro lado, também menciona que algumas estirpes podem desenvolver-se entre 5 e 45°C (Radulovic et al., 2010). Ainda mais curioso é o facto de que os isolados que se desenvolveram a temperaturas mais elevadas, foram os que revelaram melhor nível de identificação. Seria assim interessante comparar estes dados com a identificação dos isolados através de técnicas moleculares, de forma a reforçar os resultados e até identificar os eventuais clones. As técnicas moleculares para identificação de material genético no queijo, descritas na literatura são PCR, DGGE, TTGE, RAPD, RFLP, FISH e DHPLC (Quigley et al., 2011).

Figura 2.3.3.3 – Leitura de API 50CHL de um dos isolados após 48h de incubação a 37°C  
(foto original)



Na avaliação da atividade inibidora sobre as estirpes desafiadas, os resultados também não foram constantes. Todos os isolados possuíam efeito sinérgico sobre o *B. animalis subsp lactis* e alguns efeitos inibidores sobre *S. dysenteriae* e *E. faecium*. Não foi observado efeito sinérgico para *E. faecium*.

Vários autores avaliaram a adição da estirpe probiótica *L. paracasei* na produção de queijo simbiótico, com resultados muito promissores no que se refere a estabilidade e viabilidade das células bacterianas durante a armazenamento e a validade do alimento (Lynch et al., 1999; Ong, Henriksson & Shah, 2007; Cruz et al., 2009). Esta estirpe tem sido isolada a partir de queijos, especialmente no final do período de cura, sendo frequentemente considerada a flora dominante (Beresford et al., 2001).

A atividade antimicrobiana de *L. paracasei subsp paracasei* isolado de alimentos lácteos fermentados é de largo espectro, inibindo *Salmonella enterica subsp. enterica* BCRC 10747, *Pseudomonas aeruginosa* BCRC 11864, *Vibrio parahaemolyticus* BCRC 12864, *Enterobacter sakazakii* BCRC 13988 (Lin & Pan, Unknown) , *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Shigella flexneri*, *Shigella dysenteriae*, *Listeria innocua* (Tolinacki et al., 2010), *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Samonella* “Typhi”, *Staphylococcus aureus* (Sa, Krishnaa, Pavithrab, Hemalathab, & Ingalea, 2011) e *Porphyromonas gingivalis*. A capacidade antagônica foi associada à produção de diferentes bacteriocinas dependentes da estirpe (Pangsomboon et al., 2009).

Durante a ingestão de leite fermentado com *L. paracasei* A, por um período de quatro semanas, foi detetado um aumento da população de *Lactobacillus spp.* intestinal, verificou-se uma redução de *Clostridium spp.*, e não foi afetada a contagem de *Enterococcus spp.*, anaeróbios totais ou *Bacteroides spp.* (Marzotto et al., 2006). Após cessar a ingestão de *L. paracasei*, esta bactéria persistiu no intestino durante pelo menos uma semana e no final do “wash out” a microbiota intestinal endógena reequilibrou-se novamente (Marzotto et al., 2006; Nishida, Michinaka, Nakashima, Iino & Fuji, 2008). A sobrevivência no trato gastrointestinal e a capacidade de adesão às células intestinais humanas têm sido relatadas de forma positiva em trabalhos experimentais “in vitro” e “in vivo” (Crittenden et al., 2002; Ortu et al., 2007; Nishida et al., 2008; Radulovic et al. 2010).

Estão também descritas propriedades imunomoduladoras com o consumo de *L. paracasei* LTH 2579 (Janheris et al., 2002) e em alguns casos após o consumo de leite suplementado com *L. paracasei* 33 houve alguma melhora na sintomatologia de pacientes com rinite alérgica perene (Wang, Lin, Wang, & Hsu, 2004).

Os isolados do Queijo da Ilha foram todos identificados como *L. paracasei subsp paracasei* var 1 e 3 e não manifestaram uma atividade antimicrobiana constante sobre *S. dysenteriae*. Seria de esperar um antagonismo evidente, porém a possibilidade de existir mais do que uma variante pode também influenciar a produção de substâncias antimicrobianas

dependentes da estirpe. O mesmo aconteceu com *E. faecium*, em que alguns isolados manifestaram ação inibidora.

### 2.3.3.2 - Isolados identificados no “Parmigiano Reggiano”

No queijo “Parmigiano Reggiano”, as BAL viáveis e dominantes de fases avançadas da cura pertencem ao grupo casei (*L. paracasei*, *L. rhamnosus*) e *P. acidilactici*, contudo já foram isolados *L. buchneri* em fases avançadas.

Das amostras do queijo “Parmigiano Reggiano” obtiveram-se 3 isolados identificados: *L. rhamnosus*, *L. buchneri* e *L. curvatus*. Ao avaliar a atividade inibidora destes isolados do queijo “Parmigiano” verificou-se que *S. dysenteriae* não foi inibida mas os 3 apresentaram efeito sinérgico sobre *B. animalis subsp lactis* e 2 sobre *E. faecium* (*L. rhamnosus* e *L. curvatus*).

*L. rhamnosus* é a única estirpe, segundo Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology (2009) do grupo casei que consegue desenvolver-se a temperaturas de 45°C e 15°C, no entanto o isolado identificado como *L. rhamnosus* não se desenvolveu a 15°C.

*L. rhamnosus* possui ação antagónica para *Shigella spp*; é referido na literatura que *S. flexneri* foi inibida pela ação do sobrenadante de *L. rhamnosus* “cell-free” (Forestier, Champs, Vatoux, & Joly, 2001) e que a inibição da adesão de *S. dysenteriae* a células Caco-2 foi conseguida pela adição prévia ou simultânea de *L. rhamnosus* (Moorthy, Murali, & Niranjali Devaraj, 2010; Pithva, Ambalam, Dave, & Vyas, 2012). Neste último caso o sobrenadante e as células tratadas pelo calor não foram capazes de inibir a adesão de forma tão eficaz, sendo necessário a adição de células viáveis. É sugerido o mecanismo de competição de recetores das células intestinais somado ao efeito sinérgico de metabolitos com propriedades antimicrobianas. Porém, a ausência de inibição do isolado *L. rhamnosus* do queijo “Parmigiano Reggiano” sobre *S. dysenteriae* é contraditória. Talvez, a ação promovida por substâncias antimicrobianas produzidas por esta estirpe *L. rhamnosus* não seja suficiente para inibir directamente *S. dysenteriae*.

A atividade biótica de *L. rhamnosus* sobre *E. faecium* foi muito particular, pois promoveu uma inibição com um sinergismo secundário (figura 2.3.2.3). Na literatura encontra-se descrita uma ação antimicrobiana sobre *E. faecalis* através da produção de metabolitos e propriedades de adesão. Contudo, a interação sinérgica do *L. rhamnosus* e *E. faecium* confirma o uso da combinação destas duas estirpes em produtos probióticos como aditivos alimentares da produção animal permitidos na UE (Franz et al., 2011).

A atividade antagónica “in vitro” de *L. rhamnosus* sobre bactérias patogénicas é muito ampla, inibindo *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella Typhimurium* e *Listeria monocytogenes* (Gopal et al., 2001; Lee et al., 2011). No entanto, compostos de baixo peso molecular com propriedades antimicrobianas não inibiram outros



lactobacilos (Silva, Jacobus, Deneke, & Gorbach, 1987). A atividade antagonista desta bactéria já foi demonstrada “*in vivo*” sobre ratos infetados com *S. Typhimurium* (Hudault, Liévin, Bernet-Camard, & Servin, 1997). Detetaram-se propriedades antimicrobianas do sobrenadante “*cell-free*” de *L. rhamnosus* LC35 (Forestier et al., 2001) e de *L. rhamnosus* GP1 (Sarika, Lipton, & Aishwarya, 2010) provavelmente devido à presença de substâncias proteicas do tipo bacteriocina, estáveis a variações de temperatura mas de largo espectro de ação.

*L. rhamnosus* já demonstrou possuir propriedades imunomoduladoras com um impacto benéfico sobre o consumidor (Saarela et al., 2000) e capacidade em inibir a adesão de bactérias patogénicas à parede de células intestinais através da competição pelos seus recetores. *L. rhamnosus* GG inibiu “*in vitro*” a adesão de *B. vulgatus*, *C. histolyticum*, *C. difficile* e *St. aureus*. No mesmo trabalho experimental a estirpe *L. rhamnosus* LC705 inibiu a adesão de *S. Typhimurium* (Collado, Meriluoto, & Salminen, 2007).

*L. buchneri* já foi previamente isolado em queijos de cura prolongadas mas em nenhum momento foi definido como população dominante (Beresford et al., 2001; Gala et al., 2008). Neste trabalho, o isolado *L. buchneri* não representa a microbiota maioritária pois, no desenvolvimento em caldo de MRS, foi uma entre duas bactérias que produziram gás. Este facto é uma característica típica da BAL heterofermentativa capaz de produzir CO<sub>2</sub> a partir de glucose, grupo ao qual pertence *L. buchneri* (Bergey & Krieg, 2009). Porém o desenvolvimento a 45 °C, não é compatível com a descrição de Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology (2009), que determina a ausência de desenvolvimento a esta temperatura. Talvez o gradual aumento de temperatura durante o “trabalho” da coalhada tenha permitido a sobrevivência de algumas células bacterianas, que por mutação desenvolveram termotolerância, manifestando desenvolvimento bacteriano a temperaturas mais elevadas (45°C).

*L. buchneri* é utilizado com frequência como inóculo em silagens, participando no processo de fermentação vegetal (Giraffa et al., 2010) através da produção de ácido láctico e ácido acético (Liu, Skinner-Nemec, & Leathers, 2008), permitindo o controlo do desenvolvimento de microrganismos indesejados. Esta bactéria demonstrou uma forte atividade antagonista para *C. jejuni* (Grimoud et al., 2010) e produz uma bacteriocina, a buchnericina, capaz de inibir espécies de *Listeria spp.*, *Bacillus spp.*, *Enterococcus spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Leuconostocs spp.*, *Micrococcus spp.*, *Pediococcus spp.* e *Streptococcus spp.* No entanto não apresentou ação inibidora sobre a *S. flexneri* ATCC 12022 (Yildirim & Yildirim, 2001).

A ausência de um efeito inibidor de *L. buchneri* isolado do “Parmigiano” sobre *S. dysenteriae* pode ser justificada pelo estreito espectro de ação característico de substâncias proteicas como bacteriocinas, não possuindo desta forma propriedade antagónica sobre o género *Shigella spp.* É interessante referir a ausência de efeito sobre *E. faecium* pois não está de

acordo com o potencial antimicrobiano de *L. buchneri* sobre *Enterococcus spp* descrito noutros trabalhos.

Estirpes de *L. buchneri* têm demonstrado possuir resistência às condições do trato gastrointestinal “*in vitro*” e têm manifestado potencial na redução do colesterol sérico (Zeng, Pan, & Guo, 2010).

O terceiro isolado, *L. curvatus*, já foi isolado no leite destinado ao fabrico do queijo “Parmigiano Reggiano”, porém a sua presença no final do período de cura não se encontra documentada (Coppola et al., 2000). Esta bactéria tem sido isolada nalguns queijos, por exemplo, Gouda (Van Hoorde, Verstraete, Vandamme, & Huys, 2008), Darfiyeh um queijo artesanal Libanês (Serhan et al., 2009) e Cheddar (Beresford et al., 2001), no entanto em nenhum destes estudos é considerada como microbiota dominante.

Segundo o Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology (2009), *L. curvatus* não se desenvolve à temperatura de 45°C, contudo neste trabalho verificou-se o contrário. A justificação para este dado poderá ser o efeito de adaptação ao aumento gradual da temperatura no “trabalho” da coalhada.

A atividade biótica do isolado *L. curvatus* não promoveu a inibição de *S. dysenteriae*. De facto, o espectro de ação da sua bacteriocina, a curvacina, está documentado para *Listeria monocytogenes* e *E. faecalis* (Tichaczek, Vogel, & Hammes, 1993), no entanto a inibição da estirpe sobre a *E. coli* é atribuída à produção de peróxido de hidrogénio (Ghali, Thornart, & Benkerroum, 2006). Sendo assim, um espectro estreito de ação antimicrobiana é apoiado pelo resultado apresentado, demonstrando que ambos os mecanismos de ação antimicrobiana, identificados por outros autores, não promoveram a inibição deste patógeno.

No desafio de *E. faecium* registou-se novamente um efeito antagónico seguido de um sinergismo secundário.

Tem sido avaliado o efeito probiótico de diversas estirpes de *L. curvatus* ET06, ET30 e ET31, demonstrando sobrevivência às condições do trato gastro intestinal, inibição de *L. monocytogenes* através da produção de bacteriocina, ligeira inibição de outras BAL e propriedades de adesão a células Caco-2 idênticas ao probiótico *L. rhamnosus* GG (Todorov, Furtado, Saad, Tome, & Franco, 2011). Um potencial efeito imunomodulador foi identificado “*in vitro*” e “*in vivo*” utilizando células viáveis, células mortas pelo calor e o sobrenadante “cell free” de *L. curvatus* (Basker et al., 2007; Nemeth et al., 2006).

Seria de grande interesse realizar provas moleculares de forma a identificar as estirpes clones e complementar o resultado da identificação bioquímica dos isolados que neste estudo foram classificados como “Duvidosos”.

Ao observar os 67 isolados selecionados (Quadro 2. 3.3.1), para além do sinergismo para *B. animalis lactis*, constatou-se que nem todos produziram efeito inibidor sobre *S. dysenteriae*

ou *E. faecium*, existindo alguns que promoveram o desenvolvimento de *E. faecium*. O efeito sinérgico sobre *E. faecium*, parece ser vantajoso visto ser uma bactéria comensal da microbiota intestinal humana e ser também utilizado como probiótico em profilaxia ou tratamento de diarreias em animais de produção.

O efeito sinérgico sobre *B. animalis subsp lactis* dos 67 isolados é efetivamente um bom indício de um potencial probiótico da microbiota de ambos os queijos estudados. Esta propriedade poderá ser benéfica “*in vivo*” pois mesmo sem a ação antagônica sobre *Shigella dysenteriae*, a ação sobre as bactérias comensais pode promover outros mecanismos de imunomodulação, proliferação bacteriana e competição por recetores que não foram aqui estudados. Como é óbvio, o aumento do número de agentes patogénicos testados pode contribuir para determinar ações antagónicas que não foram identificadas neste trabalho.

### Capítulo III - Conclusões gerais

Os queijos sujeitos a longos períodos de cura, apresentam-se como um alimento estável e seguro, constituído por uma matriz complexa, tanto na sua microbiota como na composição química. A atividade microbiana neste ambiente é autolimitante, verificando-se selecção natural das bactérias mais aptas para as condições de pH extremas, de baixo *aw* e metabolização de outros substratos após o consumo da lactose. Neste universo, as BAL representam a microbiota dominante.

O estudo das BAL endémicas, presentes nos queijos, reveste-se de especial dificuldade, sobretudo na respetiva identificação, provavelmente porque são bactérias muito adaptadas a biótopos muito específicos e que se instalam e perpetuam no ambiente da produção. Contudo esta constatação carece de estudos mais aprofundados.

As BAL são também identificadas como elementos probióticos por possuírem propriedades benéficas para a saúde do hospedeiro através da colonização do trato gastrointestinal, da ação antimicrobiana sobre agentes patogénicos através da produção de metabolitos (bacteriocinas, ácidos orgânicos e peróxido de hidrogénio) ou pela competição dos recetores no enterócito e da ação imunomoduladora característica de algumas estirpes conhecidas.

O presente trabalho teve como objetivo detetar a presença de microrganismos com propriedades potencialmente probióticas em amostras de Queijo da Ilha de São Jorge e de “Parmigiano Reggiano”. Dos 225 isolados obtidos a partir de queijos analisados, 67 demonstraram possuir efeito sinérgico sobre *B. animalis subsp lactis* com alguma ação antimicrobiana sobre *S. dysenteriae*. A ação antagónica sobre a *Shigella* foi mais constante no Queijo da Ilha de S. Jorge do que no “Parmigiano Reggiano”, efeito evidenciado pela ação do extrato aquoso de queijo como também pela ação directa dos microrganismos isolados sobre as bactérias desafiadas.

Contudo, apesar de ter sido isolado um número inferior de microrganismos provenientes do “Parmigiano Reggiano”, a sua maioria (42%) demonstrou sinergismo sobre *B. animalis subsp lactis*, enquanto dos isolados obtidos a partir do Queijo da Ilha, apenas 25% apresentou este efeito.

Os extratos aquosos de ambos os queijos demonstraram efeitos sinérgicos para *E. faecium* e *B. animalis subsp lactis*. A presença de fragmentos celulares de células lisadas, como também de metabolitos resultantes da ação microbiana durante a cura do queijo, poderão ter servido como substratos para o desenvolvimento das estirpes desafiadas. Desta forma, em ambos os queijos a matriz parece ser promotora do desenvolvimento de alguns elementos da microbiota comensal do intestino humano. Este facto, aponta para a existência simultânea de um potencial prebiótico para além do potencial probiótico.

Procedeu-se à identificação de 10 isolados utilizando o sistema API 50 CHL. Desses, 7 foram identificados como *L. paracasei subsp paracasei* obtidos a partir do Queijo da Ilha e 3 como *L. rhamnosus*, *L. buchneri* e *L. curvatus* isolados do “Parmigiano Reggiano”.

Todas as espécies enunciadas encontram-se descritas na literatura por serem possuidoras de potenciais características probióticas, apresentando uma variedade de efeitos benéficos avaliados “*in vitro*” e “*in vivo*”.

A identificação da microbiota do queijo através de técnicas de cultivo dependentes pode ser um pouco limitante visto só se obterem células que no final do período de cura se encontram viáveis e que sobrevivam nas condições ambientais impostas no momento da incubação. Por outro lado, as BAL crescem de forma fastidiosa sendo sempre necessário mais de 48h para obtenção de UFCs.

A posterior aplicação de provas moleculares tais como PCR, DGGE, TTGE, RAPD, RFLP, FISH, DHPLC, para a avaliação do material genético das bactérias com potencial probiótico isoladas a partir dos Queijos da Ilha de São Jorge e “Parmigiano Reggiano”, apresenta-se como uma proposta promissora de estudos complementares para um conhecimento mais enriquecido dos isolados obtidos. Por outro lado, a identificação de células inviáveis, não cultiváveis ou fragmentos de parede celulares nas matrizes dos queijos poderá direccionar a realização de novos trabalhos que pretendam conhecer o potencial prebiótico através da interação dos constituintes celulares bacterianos com células entéricas humanas.

Na indústria alimentar é comum a adição de probióticos a alimentos lácteos tendo como objetivo formular novos produtos funcionais. Porém, no presente trabalho, foram isoladas estirpes microbianas com potencial probiótico que colonizam os queijos como bactérias “non starter”. A presença destas estirpes nos Queijos da Ilha de São Jorge e no “Parmigiano Reggiano” poderá adjudicar-lhes um carácter funcional que requer no futuro um estudo “*in vivo*” da interação com a microbiota intestinal humana.

Em estudos anteriores foram demonstradas alterações sobre a microbiota intestinal após o consumo de Camembert e de “Parmigiano Reggiano”, tal como foram evidenciados efeitos imunomoduladores promovidos pelos extratos aquosos de queijos dos Alpes franceses.

O efeito “*in vitro*” observado serve como uma previsão de potenciais propriedades promotoras de saúde após ingestão destes alimentos. A presença de microrganismos que possam inibir bactérias patogénicas ou favorecer o crescimento da microbiota comensal benéfica parece ser um fator motor para estudos futuros. Por outro lado, a atividade catalítica que se observa durante o período de cura promove a acumulação de péptidos e oligossacáridos que poderão ser bioativos ou promover o aumento do número de bactérias benéficas no interior do trato gastro intestinal.

Segundo o Reg. (CE) nº 1924/2006 de 20 de Dezembro e o Reg. (CE) nº 353/2008 de 18 de Abril, os fenómenos detetados como “alegações de saúde” devem ser apoiados em conhecimento científico consistente. Sendo assim, parecem ser relevantes futuros estudos

sobre os microrganismos isolados, nomeadamente, a avaliação da sobrevivência à passagem pelo trato gastrointestinal, o conhecimento da atividade antimicrobiana e metabolitos produzidos com efeito biológico (bacteriocinas, peróxido de hidrogénio e ácidos orgânicos), a susceptibilidade a antibióticos, a capacidade de adesão a células intestinais humanas e o seu possível efeito imunomodulador.

Por outro lado, a avaliação do efeito que o queijo da Ilha de São Jorge possa exercer sobre a microbiota intestinal humana é sem dúvida um percurso que deve ser aprofundado e estudado através de estudos científicos mais robustos, nomeadamente, ensaios clínicos ou inquéritos epidemiológicos em populações expostas pelo consumo versus populações não expostas.

## Bibliografia

- Agrawal, R., & Dharmesh, S. (2012). An anti-*Shigella dysenteriae* bacteriocin from *Pediococcus pentosaceus* MTCC 5151 cheese isolate. *Turk J Biol*, 36(2), 177-185.
- Araújo, E. A., Carvalho, A. F., Leandro, E. S., Furtado, M. M., & Moraes, C. A. (2010). Development of a symbiotic cottage cheese added with *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 and inulin. *J Functional Foods*, 2(1), 85-89.
- Arbolea, S., Ruas-Madiedo, P., Margolles, A., Solis, G., Salminen, S., Reyes-Gavilan, C. G., & Gueimonde, M. (2011). Characterization and in vitro properties of potentially probiotic *Bifidobacterium* strains isolated from breast-milk. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Int J Food Microbiol*, 149(1), 28-36.
- Basker, K., Reddy, P. K., Raghavendra, P., Kumar, B. G., Misra, M. C., & Prapulla, G. (2007). Screening of probiotic proprieties of lactic acid bacteria isolated from Kanjika, an ayurvedic lactic acid fermented product: an in-vitro evaluation. *J Gen Appl Microbiol*, 53, 207-213.
- Beresford, T. P., Fitzsimons, N. A., Brennan, N. L., & Cogan, T. M. (2001). Recent advances in cheese microbiology. *Int Dairy J*, 11, 259-274.
- Bergey, D. H., & Krieg, N. R. (Eds.). (2009). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (2nd ed. Vol. 3). London-New York: Springer Dordrecht Heidelberg <http://books.google.pt/books?ei=eatwT93HEc2q8AOV5anADQ&hl=pt-PT&id=0-VqgLiCPFcC&dq=biochemical+identification+of+buchneri&ots=kFz9B-Gw9x&q=paracasei#v=snippet&q=paracasei&f=false>.
- Bernardeau, M., Gueguen, M., & Vernoux, J. P. (2006). Beneficial lactobacilli in food and feed: long-term use, biodiversity and proposals for specific and realistic safety assessments. *FEMS Microbiol Rev*, 30(4), 487-513.
- Bernardeau, M., Vernoux, J. P., Henri-Dubernet, S., & Gueguen, M. (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: the *Lactobacillus* genus. [Review]. *Int J Food Microbiol*, 126(3), 278-285.
- Beuvier, E., Berthaud, K., Cegarra, S., Dansen, A., Pochet, S., Buchin, S., & Duboz, G. (1997). Ripening and quality of swiss-type cheese made from raw, pasteurized or microfiltered milk. *Int Dairy J*, 7, 311-323.
- Borriello, S. P., Hammes, W. P., Holzapfel, W., Marteau, P., Schrezenmeir, J., Vaara, M., & Valtonen, V. (2003). Safety of probiotics that contain lactobacilli or bifidobacteria. *Clin Infect Dis*, 36, 775-780.
- Çadirci, B. H., & Çitak, S. (2005). A Comparison of Two Methods Used for Measuring Antagonistic activity of Lactic Acid Bacteria. *Pakistan J of Nutrit*, 4(4), 237-241.
- Cenci, G., Rossi, J., Trotta, F., & Caldini, G. (2002). Lactic Acid Bacteria Isolated from Dairy Products Inhibit Genotoxic Effect of 4-Nitroquinoline-1-oxide in SOS-Chromotest. *Syst Appl Microbiol*, 25(4), 483-490.

- Charteris, W. P., Kelly, P. M., Morelli, L., & Collins, J. K. (1998). Development and application of an *in vitro* methodology to determine the transit of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. *J Appl Microbiol*, 84(5), 759 - 768.
- Cogan, T. M., Barbosa, M., Beuvier, E., Bianchi-Salvadori, B., Coccocelli, P.S., Fernandes, I., Gomez, J., Gomez, R., Kalantzopoulos, G., Ledda, A., Medina, M., Rea, M.C., & Rodriguez, E. (1997). Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products. *J Dairy Res*, 64, 409-421.
- Collado, M. C., Meriluoto, J., & Salminen, S. (2007). In vitro analysis of probiotic strain combinations to inhibit pathogen adhesion to human intestinal mucus. *Food Res Int*, 40(5), 629-636.
- Conzorzio Parmigiano Reggiano. <http://www.parmigiano-reggiano.it/>.
- Coppa, G. V. (2007). Caratterizzazione biochimica dei carboidrati contenuti nel formaggio Parmigiano Reggiano a diversi tempi de stagionatura. [www.parmigiano-reggiano.it/area\\_tecnica/valore\\_nutrizionale/default.aspx-2008](http://www.parmigiano-reggiano.it/area_tecnica/valore_nutrizionale/default.aspx-2008).
- Coppa, G. V. (2011). Gli oligosaccaridi: i potenziali prebiotici del Parmigiano Reggiano. *Pediatria Preventiva & Sociale, Suplemento 2*, 2.
- Coppola, R., Nanni, M., Iorizzo, M., Sorrentino, A., Sorrentino, E., Chiavari, C., & Grazia, L. (2000). Microbiological characteristics of Parmigiano Reggiano cheese during the cheesemaking and the first months of the ripening. *Lait*(80), 479-490.
- Coppola, R., Nanni, M., Iorizzo, M., Sorrentino, A., Sorrentino, E., & Grazia, L. (1997). Survey of lactic acid bacteria isolated during the advanced stages of the ripening of Parmigiano Reggiano cheese. *J Dairy Res* 64, 305-310.
- Crittenden, R., Saarela, M., Mättö, J., Ouwehand, A. C., Salminen, S., Pelto, L., Vaughan, E.E., Vos, W.N., Wright, A., Fondén, R & Mattila-Sandholm, T. (2002). *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* F19: Survival, Ecology and Safety in the Human Intestinal Tract—A Survey of Feeding Studies within the PROBDEMO Project. *Microb Ecol in Health and Dis, Suppl 3*, 22-26.
- Crow, V. L., Coolbear, T., Gopal, P. K., Martley, F. G., McKay, L. L., & Riepe, H. (1995). The role of autolysis of lactic acid bacteria in the ripening of cheese. *Int Dairy J*, 5, 855-875.
- Crow, V. L., Curry, B., & Hayes, M. (2001). The ecology of non-starter lactic bacteria (NSLAB) and their use as adjuncts in New Zealand Cheddar. *Int Dairy J*, 11, 275-283.
- Cruz, A. G., Buriti, F., C., Souza, C. H., Faria, J. A., & Saad, S. M. (2009). Probiotic cheese: Health benefits, technological and stability aspects. *Trends in Food Sci & Technol*, 20(8), 344-354.
- Dabour, N., LaPointe, G., Benhamou, N., Fliss, I., & Kheadr, E. E. (2005). Application of ruthenium red and colloidal gold-labeled lectin for the visualization of bacterial



exopolysaccharides in Cheddar cheese matrix using transmission electron microscopy. *Int Dairy J*, 15(10), 1044-1055.

Decreto Regulamentar Regional nº 24/86/A de 9 de Julho 1986, *Diário da Republica nº 155 - I série*. Assembleia Regional dos Açores. Angra do Heroísmo.

Di Cagno, R., De Angelis, M., Limitone, A., Fox, P. F., & Gobbetti, M. (2006). Response of *Lactobacillus helveticus* PR4 to heat stress during propagation in cheese whey with a gradient of decreasing temperatures. *Appl Environ Microbiol*, 72(7), 4503-4514.

Drago, L., Gismondo, M. R., Lombardi, A., Haën, C., & Gozzini, L. (1997). Inhibition of in vitro growth of enteropathogens by new *Lactobacillus* isolates of human intestinal origin. *FEMS Microbiol Lett*, 153(2), 455-463.

Durrieu, C., Degraeve, P., Chappaz, S., & Martial-Gros, A. (2006). Immunomodulating effects of water-soluble extracts of traditional French Alps cheeses on a human T-lymphocyte cell line. *Int Dairy J*, 16(12), 1505-1514.

European Food Safety Authority. (2005). Opinion of the Scientific Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed on the updating of the criteria used in the assessment of bacteria for resistance to antibiotics of human or veterinary importance. *The EFSA Journal*, 223, 1-12.

European Food Safety Authority. (2007). Introduction of a Qualified Presumption of Safety (QPS) approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA. *The EFSA Journal*, 587, 1-16.

Fenelon, M. A., O'Connor, P., & Guinee, T. P. (2000). The effect of fat content during microbiology and proteolysis in Cheddar cheese during ripening *J Dairy Sci*, 83(10), 2173-2183.

Fernandez, M. I., & Sansonetti, P. J. (2003). *Shigella* interaction with intestinal epithelial cells determines the innate immune response in shigellosis. *Int J Med Microbiol*, 293(1), 55-67.

Firmesse, O., Alvaro, E., Mogenet, A., Bresson, J. L., Lemee, R., Le Ruyet, P., Bonhomme, C., Lambert, D., Andrieux, C., Dore, J., Corthier, G., Furet, J. P., & Rigottier-Gois, L. (2008). Fate and effects of Camembert cheese micro-organisms in the human colonic microbiota of healthy volunteers after regular Camembert consumption. [Randomized Controlled Trial]. *Int J Food Microbiol*, 125(2), 176-181.

Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization. (2002). Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food (pp. 1-11). London Ontario, Canada: Joint FAO/WHO Working Group Report.

Forestier, C., Champs, C., Vatoux, C., & Joly, B. (2001). Probiotic activities of *Lactobacillus casei rhamnosus*: in vitro adherence to intestinal cells and antimicrobial properties. *Res Microbiol*, 152, 167-173.

Fox, P. F., Guinee, T. P., Cogan, T. M., & McSweeney, P. L. H. (2000). *Fundamentals of Cheese Science*. Gaithersburg, Maryland, USA: Aspen Publishers, Inc.

- Fox, P. F., & McSweeney, P. L. H. (2004). Cheese: an overview. In Elsevier (Ed.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology* (Third ed., Vol. 1, pp. 609). London, UK: Elsevier.
- Fox, P. F., Wallace, J. M., Morgan, S., Lynch, C. M., Niland, E. J., & Tobin, J. (1996). Acceleration of cheese ripening. *Antonie van Leeuwenhoek*, 70(271-297).
- Franz, C. M., Huch, M., Abriouel, H., Holzapfel, W., & Galvez, A. (2011). Enterococci as probiotics and their implications in food safety. *Int J Food Microbiol*, 151(2), 125-140.
- Gaggia, F., Mattarelli, P., & Biavati, B. (2010). Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Int J Food Microbiol*, 141 Suppl 1, S15-28.
- Gala, E., Landi, S., Solieri, L., Nocetti, M., Pulvirenti, A., & Giudici, P. (2008). Diversity of lactic acid bacteria population in ripened Parmigiano Reggiano cheese. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Int J Food Microbiol*, 125(3), 347-351.
- Gardiner, G. E., Heinemann, C., Bruce, A. W., Beuerman, D., & Reid, G. (2002). Persistence of *Lactobacillus fermentum* RC-14 and *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 but not *L. rhamnosus* GG in the human vagina as demonstrated by randomly amplified polymorphic DNA. *Clin Diagn Lab Immunol*, 9(1), 92-96.
- Gatti, M., De Dea Lindner, J., De Lorentiis, A., Bottari, B., Santarelli, M., Bernini, V., & Neviani, E. (2008). Dynamics of whole and lysed bacterial cells during Parmigiano-Reggiano cheese production and ripening. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Appl Environ Microbiol*, 74(19), 6161-6167.
- Gaya, P., Medina, M., Rodríguez-Marin, M. A., & Nuñez, M. (1990). Accelerated ripening of ewes' milk Manchego cheese: the effect of elevated ripening temperatures. *J Dairy Sci*, 73(1), 26-32.
- Georgieva, R., Iliev, I., Haertlé, T., Chobert, J. M., Ivanova, I., & Danova, S. (2009). Technological properties of candidate probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. *International Dairy Journal*, 19(11), 696-702. doi: 10.1016/j.idairyj.2009.06.006
- Georgieva, R., Iliev, I. N., Chipeva, V. A., Dimitonova, S. P., Samelis, J., & Danova, S. T. (2008). Identification and in vitro characterisation of *Lactobacillus plantarum* strains from artisanal Bulgarian white brined cheeses. *J Basic Microbiol*, 48(4), 234-244.
- Ghadimi, D., Folster-Holst, R., de Vrese, M., Winkler, P., Heller, K. J., & Schrezenmeir, J. (2008). Effects of probiotic bacteria and their genomic DNA on TH1/TH2-cytokine production by peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of healthy and allergic subjects. *Immunobiology*, 213(8), 677-692.
- Ghaffi, H., Thornart, P., & Benkerroum, N. (2006). Inhibitory activity of *Lactobacillus curvatus* CWBI-B28 against *Listeria monocytogenes* and ST-verotoxin producing *Escherichia coli* O157. *African J Biotechnol*, 5(22), 2303-2306.
- Giraffa, G., Chanishvili, N., & Widyastuti, Y. (2010). Importance of lactobacilli in food and feed biotechnology. *Res Microbiol*, 161(6), 480-487.

- Gopal, P. K., Prasad, J., Smart, J., & Gill, H. S. (2001). In vitro adherence properties of *Lactobacillus rhamnosus* DR20 and *Bifidobacterium lactis* DR10 strains and their antagonistic activity against an enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Int J Food Microbiol*, 67(3), 207-216.
- Grimoud, J., Durand, H., Courtin, C., Monsan, P., Ouarne, F., Theodorou, V., & Roques, C. (2010). In vitro screening of probiotic lactic acid bacteria and prebiotic glucooligosaccharides to select effective synbiotics. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Anaerobe*, 16(5), 493-500.
- Guo, Z., Wang, J., Yan, L., Chen, W., Liu, X., & Zhang, H. P. (2009). In vitro comparison of probiotic properties of *Lactobacillus casei* Zhang, a potential new probiotic, with selected probiotic strains. *LWT - Food Sci and Technol*, 42(10), 1640-1646.
- Gupta, V., & Garg, R. (2009). Probiotics. *Indian J Med Microbiol*, 27(3), 202-209.
- Gurira, O. Z., & Buys, E. M. (2005). Characterization and antimicrobial activity of *Pediococcus* species isolated from South African farm-style cheese. *Food Microbiol*, 22(2-3), 159-168.
- Hosono, A., Otani, H., Yasui, H., & Watanuki, M. (2002). Impact of fermented milk on human health: Cholesterol-lowering and immunomodulatory properties of fermented milk. *Animal Sci J*, 73(4), 241-256.
- Hsieh, M. H., & Versalovic, J. (2008). The human microbiome and probiotics: implications for pediatrics. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S.]. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care*, 38(10), 309-327.
- Hudault, S., Liévin, V., Bernet-Camard, M. F., & Servin, A. L. (1997). Antagonistic Activity Exerted In Vitro and In Vivo by *Lactobacillus casei* (Strain GG) against *Salmonella typhimurium* C5 infection. *App and Environ Microbiol*, 63(2), 513-518.
- Iannitti, T., & Palmieri, B. (2010). Therapeutical use of probiotic formulations in clinical practice. [Review]. *Clin Nutr*, 29(6), 701-725.
- Istituto Nazionale di Ricerca per gli Alimenti e la Nutrizione. (2008). Dossier - Il Parmigiano Reggiano: un prodotto naturalmente funzionale. Roma: INRAN.
- Ivory, K., Chambers, S. J., Pin, C., Prieto, E., Arques, J. L., & Nicoletti, C. (2008). Oral delivery of *Lactobacillus casei* Shirota modifies allergen-induced immune responses in allergic rhinitis. [Randomized Controlled Trial Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Clin Exp Allergy*, 38(8), 1282-1289.
- Janheris, G., Vogelsang, H., Kiessling, G., Schubert, R., Bunte, C., & Hammes, W. P. (2002). Influence of probiotic sausage (*Lactobacillus paracasei*) on blood lipids and immunological parameters of healthy volunteers. *Food Res Int*, 35, 133-138.
- Jimeno, J., Lazaro, M. J., & Sollberger, H. (1995). Antagonistic interactions between propionic bacteria and non-starter lactic acid bacteria. *Lait*, 75, 401-413.

- Jonkers, D., & Stockbrügger, R. (2003). Probiotics and inflammatory bowel disease. *J R Soc Med*, 96, 167-161.
- Kalyani Nair, K., Kharb, S., & Thompson, D. K. (2010). Inulin Dietary Fiber with Functional and Health Attributes—A Review. *Food Rev Int*, 26(2), 189-203.
- Kékessy, D. A., & Piguet, J. D. (1970). New Method for detecting bacteriocin production. *Appl Microbiol*, 20(2), 282-283.
- Klare, I., Konstabel, C., Muller-Bertling, S., Reissbrodt, R., Huys, G., Vancanneyt, M., Swings, J., Goossens, H., & Witte, W. (2005). Evaluation of new broth media for microdilution antibiotic susceptibility testing of *Lactobacilli*, *Pediococci*, *Lactococci*, and *Bifidobacteria*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Appl Environ Microbiol*, 71(12), 8982-8986.
- Kongo, J. M., Gomes, A. M., Malcata, F. X., & McSweeney, P. L. H. (2009). Microbiological, biochemical and compositional changes during ripening of São Jorge – a raw milk cheese from the Azores (Portugal). *Food Chemistry*, 112(1), 131-138.
- Kongo, J. M., Ho, A. J., Malcata, F. X., & Wiedmann, M. (2007). Characterization of dominant lactic acid bacteria isolated from Sao Jorge cheese, using biochemical and ribotyping methods. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *J Appl Microbiol*, 103(5), 1838-1844.
- Lane, C. N., Fox, P. F., Walsh, E. M., Folkertsma, B., & McSweeney, P. L. H. (1997). Effect of compositional and environmental factors on the growth of indigenous non-starter lactic acid bacteria in Cheddar cheese. *Lait*, 77, 561-573.
- Law, B. (2001). Controlled and accelerated cheese ripening: the research base for new technologies. *Int Dairy J*, 11, 383-398.
- Lee, J., Yun, H. S., Cho, K. W., Oh, S., Kim, S. H., Chun, T., Kim, B., & Whang, K. Y. (2011). Evaluation of probiotic characteristics of newly isolated *Lactobacillus* spp.: immune modulation and longevity. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Int J Food Microbiol*, 148(2), 80-86.
- Lee, J. W., Shin, J.G., Kim, E.H., Kang, H.E., Yim, I.B., Kim, J.Y., Joo, H.G., & Woo, H. (2004). Immunomodulatory and antitumor effects in vivo by the cytoplasmic fraction of *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium longum*. *J Vet Sci*(5), 8.
- Lievin-Le Moal, V., Sarrazin-Davila, L. E., & Servin, A. L. (2007). An experimental study and a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial to evaluate the antisecretory activity of *Lactobacillus acidophilus* strain LB against nonrotavirus diarrhea. [Randomized Controlled Trial]. *Pediatrics*, 120(4), 795-803.
- Lin, T. H., & Pan, T. M. (Unknown). Antimicrobial activity of metabolites produced by *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* NTU 101 and *Lactobacillus plantarum* NTU 102
- Liu, S., Skinner-Nemec, K. A., & Leathers, T. D. (2008). *Lactobacillus buchneri* strain NRRL B-30929 converts a concentrated mixture of xylose and glucose into ethanol and other products. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 35(2), 75-81.

- Lodics, T. A., & Steenson, L. R. (1993). Phage-host interactions in commercial mixed-strain dairy starter cultures: Practical significance - A review *J Dairy Sci*, 76, 2380-2391.
- Losito, I., Carbonara, T., Domenica De Bari, M., Gobetti, M., Palmisano, F., Rizzello, C. G., & Zambonin, P. G. (2006). Identification of peptides in antimicrobial fractions of cheese extracts by electrospray ionization ion trap mass spectrometry coupled to a two-dimensional liquid chromatographic separation. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 20(3), 447-455.
- Lynch, C. M., Muir, D. D., Banks, J. M., McSweeney, P. L. H., & Fox, P. F. (1999). Influence of Adjunct Cultures of *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* or *Lactobacillus plantarum* on Cheddar Cheese Ripening. *J Dairy Sci*(82), 1618-1628.
- Macedo, A., Malcata, F. X., & Oliveira, J. C. (1993). The technology, chemistry and microbiology of serra cheese: A review. *J Dairy Sci*, 76, 1725–1739.
- Maietti, L., Bonvini, B., Huys, G., & Giraffa, G. (2007). Incidence of antibiotic resistance and virulence determinants among *Enterococcus italicus* isolates from dairy products. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Syst Appl Microbiol*, 30(6), 509-517.
- Makras, L., Van Acker, G., & De Vuyst, L. (2005). *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* 8700:2 degrades inulin-type fructans exhibiting different degrees of polymerization. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Appl Environ Microbiol*, 71(11), 6531-6537.
- Malin, M., Verronen, P., Korhonen, H., Syväoja, EL, Salminen, S., Mykkänen, H, Arvilommi, H, Eerola, E, , & Isolauri, E. (1997). Dietary therapy with *Lactobacillus* GG, bovine colostrum or bovine immune colostrum in patients with juvenile chronic arthritis: evaluation of effect on gut defence mechanisms. *Inflammopharmacology*, 5(3), 219-236.
- Marques, T. M., Wall, R., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., Ryan, C. A., & Stanton, C. (2010). Programming infant gut microbiota: influence of dietary and environmental factors. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Curr Opin Biotechnol*, 21(2), 149-156.
- Marschan, E., Kuitunen, M., Kukkonen, K., Poussa, T., Sarnesto, A., Haahtela, T., Korpela, R., Savilahti, E, & Vaarala, O. (2008). Probiotics in infancy induce protective immune profiles that are characteristic for chronic low-grade inflammation. *Clin Exp Allergy* 38(4), 611-618.
- Marteau, P. R., Vrese, M., Cellier, C. J., & Schrezenmeir, J. (2001). Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. *The American J of Clin Nutrit*, 73(2), 430-436.
- Marzotto, M., Maffeis, C., Paternoster, T., Ferrario, R., Rizzotti, L., Pellegrino, M., Dellaglio, F., & Torriani, S. (2006). *Lactobacillus paracasei* A survives gastrointestinal passage and affects the fecal microbiota of healthy infants. [Randomized Controlled Trial]. *Res Microbiol*, 157(9), 857-866.
- Masco, L., Ventura, M., Zink, R., Huys, G., & Swings, J. (2004). Polyphasic taxonomic analysis of *Bifidobacterium animalis* and *Bifidobacterium lactis* reveals relatedness at the subspecies level: reclassification of *Bifidobacterium animalis* as *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis* subsp. nov. and *Bifidobacterium lactis* as *Bifidobacterium*

*animalis subsp. lactis subsp. nov.* [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 54(Pt 4), 1137-1143.

Metchnikoff, I. I. (Ed.). (2004). *The prolongation of life: Optimistic studies* (reprinted edition 1907 ed.). New York, NY, USA: Springer.

Mohankumar, A., & Murugalatha, N. (2011). Characterization and Antibacterial Activity of Bacteriocin Producing *Lactobacillus* Isolated from Raw Cattle Milk Sample. *Int J of Biol*, 3(3).

Moorthy, G., Murali, M. R., & Niranjali Devaraj, S. (2010). Lactobacilli inhibit *Shigella dysenteriae* 1 induced pro-inflammatory response and cytotoxicity in host cells via impediment of Shigella-host interactions. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Dig Liver Dis*, 42(1), 33-39.

Morandi, S., & Brasca, M. (2012). Safety aspects, genetic diversity and technological characterisation of wild-type *Streptococcus thermophilus* strains isolated from north Italian traditional cheeses. *Food Control*, 23(1), 203-209.

Nemeth, E., Fajdiga, S., Malago, J., Koninkx, J., Tooten, P., & van Dijk, J. (2006). Inhibition of *Salmonella*-induced IL-8 synthesis and expression of Hsp70 in enterocyte-like Caco-2 cells after exposure to non-starter lactobacilli. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Int J Food Microbiol*, 112(3), 266-274.

Neviani, E., Lindner, J., Bernini, V., & Gatti, M. (2009). Recovery and differentiation of long ripened cheese microflora through a new cheese-based cultural medium. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Food Microbiol*, 26(3), 240-245.

Nishida, S., Michinaka, A., Nakashima, K., Iino, H., & Fujii, T. (2008). Evaluation of the probiotic potential of *Lactobacillus paracasei* KW3110 based on in vitro tests and oral administration tests in healthy adults. *J Gen Appl Microbiol*(54), 267-276.

Ong, L., Henriksson, A., & Shah, N. P. (2007). Proteolytic pattern and organic acid profiles of probiotic Cheddar cheese as influenced by probiotic strains of *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. paracasei*, *Lb. casei* or *Bifidobacterium sp.* *Int Dairy J*, 17(1), 67-78.

Ong, L., & Shah, N. P. (2009). Probiotic Cheddar cheese: Influence of ripening temperatures on survival of probiotic microorganisms, cheese composition and organic acid profiles. *LWT - Food Science and Technology*, 42(7), 1260-1268.

Ortu, S., Felis, G. E., Marzotto, M., Deriu, A., Mollicotti, P., Sechi, L. A., Dellaglio, F., & Zanetti, S. (2007). Identification and functional characterization of *Lactobacillus* strains isolated from milk and Gioddu, a traditional Sardinian fermented milk. *Int Dairy J*, 17(11), 1312-1320.

Pancaldi, M., Mariotti, I., & Balli, F. (2008). Intestinal inflammation in nursing infants: different causes and a single treatment... but of protected origin. *Acta Biomed*(79), 144-150.

Pangsomboon, K., Bansal, S., Martin, G. P., Suntinanalert, P., Kaewnopparat, S., & Srichana, T. (2009). Further characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus paracasei* HL32. *J Appl Microbiol*, 106(6), 1928-1940.

- Pithva, S., Ambalam, P., Dave, J. M., & Vyas, B. R. (2012). Potential of Probiotic Lactobacillus Strains as Food Additives,. In Prof Yehia El-Samragy (Ed.), *Food Additive*. InTech.
- Pool-Zobel, B. L., Neudecker, C., Domizlaff, I., Ji, S., Schillinger, U., Rumney, C., Moretti, M., Vilarini, I., Scassellati-Sforzolini, R., & Rowland, I. (1996). Lactobacillus- and bifidobacterium-mediated antigenotoxicity in the colon of rats. *Nutr Cancer*(26), 15.
- Potes, M. E. M. M. S. (2000). *Microbiologia do queijo artesanal produzido na região de Évora*. Tese de Doutoramento, Universidade de Évora, Évora.
- Pretzer, G., Snel, J., Molenaar, D., Wiersma, A., Bron, P. A., Lambert, J., Vos, W. M., Van der Meer, R., Smits, M. A., & Kleerebezem, M. (2005). Biodiversity-based identification and functional characterization of the mannose-specific adhesin of *Lactobacillus plantarum*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *J Bacteriol*, 187(17), 6128-6136.
- Public Health Agency of Canada. Shigella spp. <http://www.phac-aspc.gc.ca/lab-bio/res/psds-ftss/shigella-eng.php>. Public Health Agency of Canada.
- Quigley, E. M., & Quera, R. (2006). Small intestinal bacterial overgrowth: roles of antibiotics, prebiotics, and probiotics. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Gastroenterol*, 130(2 Suppl 1), S78-90.
- Quigley, L., O'Sullivan, O., Beresford, T. P., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., & Cotter, P. D. (2011). Molecular approaches to analysing the microbial composition of raw milk and raw milk cheese. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Int J Food Microbiol*, 150(2-3), 81-94.
- Radulovic, Z., Petrovic, T., Nedovic, V., Dimitrijevic, S., Mirkovic, N., Petrusic, M., & Paunovic, D. (2010). Characterization of autochthonous *Lactobacillus paracasei* strains on potential probiotic ability. *Mljekarstvo*, 60(2), 86-93.
- Ranadheera, R. D. C. S., Baines, S. K., & Adams, M. C. (2010). Importance of food in probiotic efficacy. *Food Research International*, 43(1), 1-7.
- Rapposch, S., Eliskases-Lochner, F., & Ginzinger, W. (1999). Growth of facultative heterofermentative Lactobacilli on starter cell suspensions. *App and Environ Microbiol*, 65(12), 5597-5599.
- Regulamento (CE) nº353/2008 de 18 de Abril de 2008, *Jornal Oficial da União Europeia L. 109/11*. Parlamento Europeu e do Conselho da União Europeia.
- Regulamento (CE) nº1924/2006 de 20 de Dezembro de 2006, *Jornal Oficial da União Europeia L. 404/9*. Parlamento Europeu e do Conselho da União Europeia.
- Reid, G. (2000). In vitro testing of *Lactobacillus acidophilus* NCFM as a possible probiotic for the urogenital tract. *Int Dairy J*(10), 5.
- Ried, K. (2004). Gastrointestinal Health, the role of pro and pre-biotics is standart foods. [Review]. *Australian Family Physician*, 33, 3.

- Rizzello, C. G., Losito, I., Gobetti, M., Carbonara, T., Bari, M. D., & Zambonin, P. G. (2005). Antibacterial Activities of Peptides from the Water-Soluble Extracts of Italian Cheese Varieties. *J Dairy Sci*, 88(7), 2348-2360.
- Rossetti, L., Carminati, D., Zago, M., & Giraffa, G. (2009). A qualified presumption of safety approach for the safety assessment of Grana Padano whey starters. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Int J Food Microbiol*, 130(1), 70-73.
- Russell, D. A., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., & Stanton, C. (2011). Metabolic activities and probiotic potential of bifidobacteria. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Int J Food Microbiol*, 149(1), 88-105.
- Sa, A., Krishnaa, R. S., Pavithrab, V., Hemalathab, V., & Ingalea, P. (2011). Production and antibacterial activity of bacteriocin by *Lactobacillus paracasei* isolated from donkey milk. *Int J Curr Sci*(1), 109-115.
- Saarela, M., Mogense, G., Fondén, R., Mättö, J., & Mattila-Sandholm, T. (2000). Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. [Review Article]. *J Biotechnol*(84), 197-215.
- Sarika, A. R., Lipton, A. P., & Aishwarya, M. S. (2010). Bacteriocin Production by a New Isolate of *Lactobacillus rhamnosus* GP1 under different culture conditions. *Adv J Food Sci and Technol*, 2(5), 291-297.
- Saxelin, M., Lassig, A., Karjalainen, H., Tynkkynen, S., Surakka, A., Vapaatalo, H., Jarvenpaa, S., Korpela, R., Mutanen, M., & Hatakka, K. (2010). Persistence of probiotic strains in the gastrointestinal tract when administered as capsules, yoghurt, or cheese. [Randomized Controlled Trial Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Int J Food Microbiol*, 144(2), 293-300.
- Serhan, M., Cailliez-Grimal, C., Borges, F., Revol-Junelles, A. M., Hosri, C., & Fanni, J. (2009). Bacterial diversity of Darfiyeh, a Lebanese artisanal raw goat's milk cheese. *Food Microbiol*, 26(6), 645-652.
- Sgouras, D. N., Panayotopoulou, E. G., Martinez-Gonzalez, B., Petraki, K., Michopoulos, S., & Mentis, A. (2005). *Lactobacillus johnsonii* La1 attenuates *Helicobacter pylori*-associated gastritis and reduces levels of proinflammatory chemokines in C57BL/6 mice. *Clin Diagn Lab Immunol*, 12(12), 1378-1386.
- Silva, M., Jacobus, N. V., Deneke, C., & Gorbach, S. L. (1987). Antimicrobial Substance from Human *Lactobacillus* strain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 31(8), 1231-1233.
- Solga, S. F. (2003). Probiotics can treat hepatic encephalopathy. *Medical Hypotheses*, 61(2), 307-313.
- Sousa, M. J., Ardö, Y., & McSweeney, P. L. H. (2001). Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. *Int Dairy J*(11), 327-345.



- Stadlbauer, V., Mookerjee, R. P., Hodges, S., Wright, G. A., Davies, N. A., & Jalan, R. (2008). Effect of probiotic treatment on deranged neutrophil function and cytokine responses in patients with compensated alcoholic cirrhosis. *J Hepatol*, 48(6), 6.
- Steele, J. L., Budinich, M. F., Cai, H., Curtis, S. C., & Broadbent, J. R. (2006). Diversity and metabolic activity of *Lactobacillus casei* in ripening Cheddar cheese. *Australian J of Dairy Technol* 61(2), 53-60.
- Succi, M., Tremonte, P., Reale, A., Sorrentino, E., Grazia, L., Pacifico, S., & Coppola, R. (2005). Bile salt and acid tolerance of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from Parmigiano Reggiano cheese. *FEMS Microbiol Lett*, 244(1), 129-137.
- Thomas, T. D. (1987). Cannibalism among bacteria found in cheese. *New Zealand J Dairy Sci and Technol*, 22, 215-219.
- Tichaczek, P. S., Vogel, R., & Hammes, W. P. (1993). Cloning and sequencing of cur A encoding curvacin A, the bacteriocin produced by *Lactobacillus curvatus* LTH1174. *Arch Microbiol*, 160, 279-283.
- Tinrat, S., Saraya, S., & Chomnawang, M. T. (2011). Isolation and characterization of *Lactobacillus salivarius* MTC1026 as a potential probiotic. *J Gen Appl Microbiol*(57), 365-378.
- Todorov, S. D., Furtado, D. N., Saad, S., Tome, E., & Franco, B. D. G. M. (2011). Potential beneficial proprieties of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from smoked salmon. *J Appl Microbiol*, 110(4), 971-986.
- Tolinacki, M., Kojic, M., Lozo, J., Terzic-Vidojevic, A., Topisirovic, L., & Fira, D. (2010). Characterization of the bacteriocin-producing strain *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* BGUB9. *Arch Biol Sci*, 62(4), 889-899.
- Tuo, Y., Su, Y.-L.-M., & Zhang, H.-P. (2006). Effect of *Lb.casei* Zhang on Koumiss on the Production of Cytokines in Sera of Mouse. *Food Sci*, 27(11), 4.
- Twetman, S., Derawi, B., Keller, M., Ekstrand, K., Yucel-Lindberg, T., & Stecksen-Blicks, C. (2009). Short-term effect of chewing gums containing probiotic *Lactobacillus reuteri* on the levels of inflammatory mediators in gingival crevicular fluid. *Acta Odontol Scand*, 67(1), 19-23.
- União das Cooperativas Agrícolas de Lactício de São Jorge. <http://www.portais.ws/uniqueijo/>.
- União Europeia. (2011). Eurostat Statistics Explained Agricultural products. [http://epp.eurostat.ec.europa.eu/statistics\\_explained/](http://epp.eurostat.ec.europa.eu/statistics_explained/).
- União Europeia. (2012). Agricultura e desenvolvimento rural DOOR - Lista Produtos de Origem Protegida. <http://ec.europa.eu/agriculture/quality/door/list.html;jsessionid=pL0hL%20qgLXhNm%20FQyFl1b24mY3t9dJQPflg3xbL2YphGT4k6zdWn34!-370879141>: União Europeia.

- Van der Meulen, R., Avonts, L., & De Vuyst, L. (2004). Short Fractions of Oligofructose Are Preferentially Metabolized by *Bifidobacterium animalis* DN-173 010. *Appl Environ Microbiol*, 70(4), 1923-1930.
- Van Hoorde, K., Verstraete, T., Vandamme, P., & Huys, G. (2008). Diversity of lactic acid bacteria in two Flemish artisan raw milk Gouda-type cheeses. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Food Microbiol*, 25(7), 929-935.
- Wang, M. F., Lin, H. C., Wang, Y. Y., & Hsu, C. H. (2004). Treatment of perennial allergic rhinitis with lactic acid bacteria. *Pediatr Allergy and Immunol*, 15(2), 152-158.
- World Gastroenterology Organisation. (2008). Probiotics and prebiotics *World Gastroenterology Organisation Practice Guidelines*.
- World Health Organization. Health topics: Shigella. <http://www.who.int/topics/shigella/en/>: WHO.
- Yildirim, Z., & Yildirim, M. (2001). Characterization of Buchnericin LB Produced by *Lactobacillus buchneri* LB. activity. *Turk J Biol*, 25, 73-82.
- Zago, M., Fornasari, M. E., Carminati, D., Burns, P., Suarez, V., Vinderola, G., Reinheimer, J., & Giraffa, G. (2011). Characterization and probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from cheeses. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Food Microbiol*, 28(5), 1033-1040.
- Zannoni, M. (2010). Evolution of the sensory characteristics of Parmigiano–Reggiano cheese to the present day. *Food Quality and Preference*, 21(8), 901-905.
- Zeng, X. Q., Pan, D. D., & Guo, Y. X. (2010). The porbiotic properties of *Lactobacillus buchneri* P2. *J Appl Microbiol*, 108(6), 2059-2066.
- Zhang, H. P., Zhang, Q. J., Ren, G. Q., & Bao, Q. H. (2007). The antagonism of *Lactobacillus casei* Zhang to pathogenic *Escherichia coli* in mice and the influence on the microbial population in gut. *Microbiology*, 34(3), 4.
- Zubillaga, M., Weill, R., Postaire, E., Goldman, C., Caro, R., & Boccio, J. (2001). Effect of probiotics and functional foods and their use in different diseases. *Nutrit Res*(21), 569-579.

## Anexos

### Resultado de provas bioquímicas dos isolados selecionados

Cod	Temperatura (°C)		NaCl (%)		Produção gás caldo MRS	Cod	Temperatura (°C)		NaCl (%)		Produção gás caldo MRS
	45	15	4	6,5			45	15	4	6,5	
6	n	n	n	n	n	109	n	p	p	p	n
7	n	n	n	n	n	121	p	p	p	p	n
11	n	p	n	n	n	126	n	p	p	p	n
12	n	n	n	n	n	138	n	p	p	n	n
13	n	n	n	n	n	148	p	p	p	p	n
16	p	p	p	p	n	150	p	n	p	n	n
17	n	p	p	p	n	155	n	p	p	p	n
18	p	p	p	p	n	159	n	p	p	p	n
21	p	p	p	p	n	186	p	p	p	p	n
22	p	p	p	p	n	190	p	p	p	p	n
23	p	p	p	n	n	191	p	n	p	p	n
24	p	p	p	p	n	195	n	n	n	n	n
25	p	p	p	p	n	196	p	n	p	p	n
27	p	p	p	p	n	197	p	p	p	p	n
29	p	p	p	p	n	199	p	n	p	n	n
30	n	p	p	p	n	201	p	p	p	p	n
32	p	p	p	p	n	202	p	p	p	n	p
33	p	p	p	p	n	205	p	n	p	p	n
34	p	p	p	p	n	206	p	p	p	p	n
38	p	n	p	n	n	207	p	p	p	n	p
56	n	p	p	p	n	209	p	n	p	p	n
58	n	p	p	p	n	210	p	p	p	p	n
66	n	p	p	p	n	211	p	n	p	p	n
69	n	p	p	p	n	212	p	n	p	p	n
70	n	p	p	p	n	213	p	n	p	n	n
75	n	p	p	n	n	214	p	n	p	p	n
78	n	n	p	n	n	215	p	n	p	p	n
85	n	n	p	n	n	216	p	n	p	p	n
86	n	n	p	n	n	217	p	n	p	p	n
92	n	p	p	p	n	218	p	p	p	p	n
93	n	n	n	n	n	219	p	p	p	p	n
106	n	p	p	n	n	220	p	p	p	p	n
108	n	p	p	p	n	224	p	p	p	n	n
						225	p	p	p	p	n

Legenda: p - desenvolvimento bacteriano/produção de gás; n - ausência de crescimento bacteriano ou de produção de gás